

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE PSICOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

**Estudio de los efectos del tratamiento con antidepresivos
sobre el consumo de alcohol**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Antonio Ballesta García

DIRECTORES

Laura Orío Ortiz
Francisco Alén Fariñas

Madrid



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE LOS EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON ANTIDEPRESIVOS SOBRE EL
CONSUMO DE ALCOHOL**

ANTONIO BALLESTA GARCÍA

Dirigido por:

DRA. LAURA ORÍO ORTIZ

DR. FRANCISCO ALÉN FARIÑAS

Madrid, 2019

Facultad de Psicología



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. Antonio Ballesta García _____,
estudiante en el Programa de Doctorado R.D. 99/2011 _____,
de la Facultad de Psicología _____ de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

Estudio de los efectos del tratamiento con antidepresivos sobre el consumo de alcohol

y dirigida por: LAURA ORÍO ORTIZ Y FRANCISCO ALÉN FARIÑAS

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 11 de julio _____ de 2019

Fdo.: _____

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID
FACULTAD DE PSICOLOGÍA

Dra. LAURA ORÍO ORTIZ, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Psicobiología y Metodología en Ciencias del Comportamiento de la Facultad de Psicología de la Universidad Complutense de Madrid,

y

Dr. FRANCISCO ALÉN FARIÑAS, Profesor Asociado del Departamento de Psicobiología y Metodología en Ciencias del Comportamiento de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICAN:

Que D. ANTONIO BALLESTA GARCÍA ha realizado en el Departamento de Psicobiología y Metodología en Ciencias del Comportamiento, bajo nuestra dirección, la presente Tesis Doctoral titulada: *"Estudio de los efectos del tratamiento con antidepresivos sobre el consumo de alcohol"*

Revisado el presente trabajo, consideramos que tanto el contenido científico como la presente memoria reúnen los requisitos necesarios para su defensa, y optar al grado de Doctor.

Y para que conste ante quien proceda firmamos el siguiente documento a

12...de ...julio...de 2019

Fdo: Laura Orío

Fco: Francisco Alén

A mis abuelos, ejemplo de sacrificio, humildad y entrega

“Do or do not, there is no try”

Master Yoda

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral trasciende de lo que muestra el documento en sí mismo, en el no figuran los nombres ni se refleja la contribución de muchísimas personas implicadas en ella, sin las cuales no habría sido posible su realización.

En primer lugar, no puedo sino expresar mi gratitud hacia las personas que me han guiado a lo largo de esta etapa. Mis directores, la Dra. Laura Orío y el Dr. Francisco Alén, han depositado en mí su confianza para la consecución de los objetivos de este trabajo, pero al mismo tiempo han invertido (mucho) esfuerzo y (más que mucha) paciencia cuando más lo he necesitado. Me han brindado oportunidades de aprender y han infundido en mí una pasión por la investigación que me ha dado fuerzas incluso en los momentos más difíciles.

En segundo lugar, mostrarle mi agradecimiento a mi familia, a mis padres y hermanos, tíos, primos y abuelos, que han estado ahí siempre para apoyarme.

También quiero mostrar mi agradecimiento a todos los miembros del equipo de investigación del IBIMA, en especial al Dr. Fernando Rodríguez de Fonseca y al Dr. Juan Suárez. Sin su esfuerzo y su trabajo, esta tesis no habría sido posible. De igual forma, agradezco a la Dra. Raquel Gómez de Heras la orientación y el apoyo que me ha dado, especialmente en los inicios de este camino.

También quiero expresar mi gratitud a las entidades que han financiado los estudios de la presente tesis, especialmente a La Red de Trastornos Adictivos (RTA), el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) y el Plan Nacional sobre Drogas del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.

Los años transcurridos en este proceso me han permitido trabajar junto a personas maravillosas, entregadas, inteligentes y trabajadoras que me han contagiado su afán por la investigación. Así, agradecer especialmente a los Drs. María Antón, Víctor Echeverry, y Javier Calleja por estar ahí desde antes del principio, en los momentos más duros, pero también en los más locos y divertidos, por ayudarme siempre de una forma en la que solo podría hacerlo alguien a quién considero al mismo tiempo un mentor y un amigo.

Un estudiante de doctorado no es nada sin un equipo de laboratorio con el que compartir penas y alegrías, frustraciones y aciertos, horas de trabajo, pero también de “descanso”. En este sentido, no puedo sino dar las gracias de haber podido trabajar junto a investigadoras maravillosas como Marta Moya, Alicia Rodríguez y Noemí Blanco. Esto ha sido posible gracias a vosotras. Igualmente, agradezco haber tenido el honor de coincidir en este camino con personas estupendas y trabajadoras como Lucía Segovia, Berta Escudero, David Martín, Belén Ruiz, Raquel Martín, Marta Roldán, Mayte Ramírez, Aarón del Pozo, Daniel Ouco, Miguel Jaimez, Eva Luna Piñel, María Donina Hernández, y María Elisa Serrano.

Finalmente, a aquellos que habéis estado antes, durante y los que seguiréis después de todo esto: Compañeros y amigos que habéis contribuido a que esto fuera posible, hemos compartido los momentos difíciles y cada pequeña victoria. Me he caído y me habéis levantado, me he perdido y me habéis encontrado, todo cuanto he vivido, llorado y reído ha sido a vuestro lado.

ÍNDICE

1. LISTA DE ABREVIATURAS	4
2. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	8
3. RESUMEN Y ABSTRACT	13
4. INTRODUCCIÓN	20
4.1 EL TRASTORNO POR USO DE ALCOHOL (TUA)	21
4.1.1 EPIDEMIOLOGÍA Y CRITERIOS DIAGNÓSTICOS	21
4.1.2 FARMACOLOGÍA DEL ALCOHOL	24
4.1.2.1 Farmacocinética	24
4.1.2.2 Farmacodinamia	27
4.1.3 NEUROBIOLOGÍA DEL TUA	33
4.1.4 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DEL TUA	38
4.2 EL TRASTORNO DEPRESIVO	41
4.2.1 EPIDEMIOLOGÍA Y CRITERIOS DIAGNÓSTICOS	41
4.2.2 NEUROBIOLOGÍA DE LA DEPRESIÓN	42
4.2.2.1 La hipótesis monoaminérgica de la depresión	42
4.2.2.2 La teoría de la neuroplasticidad de la depresión	43
4.2.3 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DE LA DEPRESIÓN	46
4.3 LA COMORBILIDAD TUA-DEPRESIÓN	51
4.3.1 NEUROBIOLOGÍA DE LA COMORBILIDAD TUA-DEPRESIÓN	54
4.3.1.1 El sistema glutamatérgico	56
4.3.1.1.1 El sistema Glutamatérgico y la neuroplasticidad	58
4.3.1.1.2 Papel del sistema Glutamatérgico en el TUA	60
4.3.1.1.3 Papel del sistema Glutamatérgico en la depresión y el tratamiento antidepresivo	62
4.3.1.2 El sistema endocannabinoide (sEC)	66
4.3.1.2.1 Papel del sEC en el TUA	69
4.3.1.2.2 Papel del sEC en la depresión y el tratamiento antidepresivo	72
4.3.1.3 La neurogénesis adulta del hipocampo	74
4.3.1.3.1 Papel de la neurogénesis del hipocampo en el TUA	76
4.3.1.3.2 Papel de la neurogénesis del hipocampo en la depresión y el tratamiento antidepresivo	77
4.4 ANTIDEPRESIVOS EN EL TUA Y LA DEPRESIÓN	78

4.4.1	EVIDENCIA CLÍNICA EN LA COMORBILIDAD TUA-DEPRESIÓN	78
4.4.2	EVIDENCIA PRECLÍNICA EN LA COMORBILIDAD TUA-DEPRESIÓN	82
5.	OBJETIVOS E HIPÓTESIS	87
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	91
6.1	DISEÑO Y PROCEDIMIENTO	92
6.2	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	93
6.3	AUTO-ADMINISTRACIÓN OPERANTE DE ALCOHOL	94
6.4	TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO ANTIDEPRESIVO	95
6.5	OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS	96
6.6	ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA	97
6.7	ANÁLISIS DE DENSIDAD DE PROTEÍNA	100
6.8	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	103
6.9	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	104
7.	RESULTADOS	105
7.1	RESULTADOS ESTUDIO 1 (ANEXO 1)	106
7.1.1	EFFECTOS DEL TRATAMIENTO CON BUPROPION Y FLUOXETINA EN EL CONSUMO DE ALCOHOL DURANTE LA RECAÍDA	106
7.1.2	EFFECTOS DEL TRATAMIENTO CON BUPROPION Y FLUOXETINA EN LOS NIVELES RELATIVOS DE ARNm Y DENSIDAD DE PROTEÍNA DE LOS COMPONENTES DEL SISTEMA GLUTAMATÉRGICO EN LA CORTEZA PREFRONTAL	107
7.1.3	EFFECTOS DEL TRATAMIENTO CON BUPROPION Y FLUOXETINA EN LOS NIVELES RELATIVOS DE ARNm Y DENSIDAD DE PROTEÍNA DE LOS COMPONENTES DEL SEC EN LA CORTEZA PREFRONTAL	109
7.2	RESULTADOS ESTUDIO 2 (ANEXO 2)	111
7.2.1	EFFECTOS DEL TRATAMIENTO CON REBOXETINA EN EL CONSUMO DE ALCOHOL DURANTE LA RECAÍDA	111
7.2.2	EFFECTOS DEL TRATAMIENTO CON REBOXETINA EN LOS NIVELES RELATIVOS DE ARNm Y DENSIDAD DE PROTEÍNA DE LOS COMPONENTES DEL SISTEMA GLUTAMATÉRGICO EN LA CORTEZA PREFRONTAL Y EL HIPOCAMPO DORSAL	112
7.2.3	EFFECTOS DEL TRATAMIENTO CON REBOXETINA EN LOS NIVELES RELATIVOS DE ARNm Y DENSIDAD DE PROTEÍNA DE LOS COMPONENTES DEL SEC EN LA CORTEZA PREFRONTAL Y EL HIPOCAMPO DORSAL	115
7.3	RESULTADOS ESTUDIO 3 (ANEXO 3)	118

7.3.1	LOS EFECTOS DEL TRATAMIENTO ANTIDEPRESIVO SOBRE LA RECAÍDA EN EL CONSUMO DE ALCOHOL Y LA NEUROGÉNESIS DEL HIPOCAMPO	118
7.3.1.1	Evidencia clínica de los efectos del tratamiento antidepresivo en la depresión y la neurogenesis en el HPC	118
7.3.1.2	Evidencia preclínica de los efectos del tratamiento antidepresivo sobre la conducta de tipo depresivo y la neurogénesis en el HPC en la abstinencia de alcohol	119
7.3.1.3	Evidencia clínica de la eficacia del tratamiento antidepresivo en el curso del TUA y la depresión	121
7.3.1.4	Evidencia preclínica de la eficacia del tratamiento antidepresivo en la recaída en el consumo de alcohol	122
7.3.1.5	Conclusiones	123
8.	<u>DISCUSIÓN</u>	<u>125</u>
9.	<u>CONCLUSIONES</u>	<u>143</u>
10.	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>146</u>
11.	<u>ANEXO</u>	<u>187</u>

1. LISTA DE ABREVIATURAS

2-AG: 2-araquidonoil glicerol
 5-HT: 5-hidroxitriptamina o serotonina
 5-HT_{2C}: Receptor de serotonina 2C
 5-HT₃: Receptor de serotonina 3
 AC: Adenilil ciclasa
 ACC: Corteza cingulada anterior
 ADE: Efecto de privación de alcohol
 ADH: Alcohol deshidrogenasa
 ADN: Ácido desoxirribonucleico
 ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario
 AEA: Araquidonoil etanolamida o anandamida
 ALDH: Aldehído deshidrogenasa
 AMPA: α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico
 AMPc: Adenosin monofosfato cíclico
 ANOVA: Análisis de varianza
 APA: Asociación Americana de Psicología
 ARN: Ácido ribonucleico
 ARNm: Ácido ribonucleico mensajero
 ATC: Antidepresivo tricíclico
 ATV: Área del tegmento ventral
 BNST: Núcleo basal de la estría terminal
 CB1: Receptor cannabinoide 1
 CB2: Receptor cannabinoide 2
 CeA: Núcleo central de la amígdala
 CMS: Estrés crónico leve
 CPF: Corteza prefrontal
 CRF: Factor liberador de corticopropina
 Ct: Ciclo umbral
 CYP2E1: Citocromo P4502E1
 DAG: Diacilglicerol
 DAGL α/β : Diacilglicerol lipasa α/β
 dIPFC: Corteza prefrontal dorsolateral

DS: Estriado dorsal

DSM V: Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales. 5ª edición

EAAC1: Transportador de aminoácidos excitatorios C1

ECs: Cannabinoides endógenos

FAAH: Amidohidrolasa de ácidos grasos

GABA: Ácido γ -aminobutírico

GABA_A: Receptor GABA tipo A

GP: Globo pálido

GPR55: Receptor acoplado a proteína G 55

H1: Receptor de histamina 1

HEPES: Ácido 4- 2-hidroxietil -1-piperazineetanosulfónico

HPC: Hipocampo

IMAO_A: Inhibidor de la monoamino oxidasa tipo A

IRDN: Inhibidor de la recaptación de dopamina y noradrenalina

IRSN: Inhibidor de la recaptación de serotonina y noradrenalina

ISRN: Inhibidor de la recaptación de noradrenalina

ISRS: Inhibidor de la recaptación de serotonina

KGA: Isoforma de glutaminasa de tipo renal

LGA: Isoforma de glutaminasa de tipo hepático

LTP: Potenciación a largo plazo

M1: receptor muscarínico 1

MAGL: Monoacilglicerol lipasa

MAO_{A/B}: Monoamino oxidasa tipo A/B

MEOS: Sistema microsomal de oxidación del etanol

mGluR: Receptor metabotrópico de glutamato

NAC: Núcleo accumbens

nAch: Receptor nicotínico de acetilcolina

NAD: Nicotinamida adenina dinucleótido

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NAPE: N-acil-fosfatidiletanolamina

NAPE-PLD: N-acil fosfatidiletanolamina-fosfolipasa D

NET: Transportador de noradrenalina

NMDA: N-metil-D-aspartato

OFC: Corteza frontal orbital

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PLC: Fosfolipasa C

PPAR α/γ : Receptor activado por proliferador de peroxisoma α/γ

sEC: Sistema endocannabinoide

SEM: Error estándar de la media

SERT: Transportador de 5-HT

SNC: Sistema nervioso central

Thal: Tálamo

TPRV1: Receptor de potencial transitorio vaniloide 1

trkB: Receptor de tirosina quinasa B

TUA: Trastorno por uso de alcohol

vlPFC: Corteza frontal ventrolateral

vmPFC: Corteza frontal ventromedial

WHO: Organización mundial de la salud

α 1: Receptor adrenérgico 1

Δ 9-THC: Δ 9-tetrahidrocannabinol

2. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1. Datos mundiales del consumo de alcohol puro per cápita durante 2016.

Figura 2. Estructura molecular del etanol.

Figura 3. Principales vías metabólicas del alcohol.

Figura 4. Interacción de la molécula de alcohol en la activación del receptor GABAA.

Figura 5. Interacción de la molécula de alcohol en la activación de los receptores NMDA y AMPA.

Figura 6. Esquema de las principales dianas moleculares del alcohol ante diferentes concentraciones y los efectos psicofisiológicos asociados.

Figura 7. Representación esquemática de los 3 estadios que constituyen en el proceso adictivo, además de las principales estructuras cerebrales y sistemas de neurotransmisión implicados en cada uno de ellos.

Figura 8. Representación gráfica del estado afectivo durante la transición que conforma el proceso adictivo.

Figura 9. Representación esquemática de los procesos de neuroplasticidad.

Figura 10. Estructura molecular y representación esquemática del mecanismo de acción de los antidepresivos tricíclicos (ATCs).

Figura 11. Estructura molecular y representación esquemática del mecanismo de acción de la fluoxetina.

Figura 12. Estructura molecular y representación esquemática del mecanismo de acción del bupropion.

Figura 13. Esquema longitudinal de la clasificación de la depresión con respecto al TUA.

Figura 14. Estructura molecular del ácido glutámico.

Figura 15. Representación esquemática de los receptores metabotrópicos de glutamato y sus rutas de señalización intracelular.

Figura 16. Arriba: Diferentes repercusiones que los efectos del estrés/administración de glucocorticoides y la señalización glutamatérgica ejercen sobre la plasticidad

sináptica a lo largo del tiempo. Abajo: Efectos de la exposición a estrés crónico sobre la morfología de las neuronas de distintas regiones cerebrales.

Figura 17. Representación esquemática de la reconfiguración en la disposición de receptores ionotrópicos de glutamato como consecuencia de la exposición crónica al alcohol.

Figura 18. Remodelación dendrítica en neuronas del HPC y la CPF ante un protocolo de estrés crónico leve (CMS) y la reversión del mismo mediante el tratamiento crónico con antidepresivos.

Figura 19. Estructura de los principales receptores cannabinoides, CB1 y CB2.

Figura 20. Estructura molecular de los dos principales ECs.

Figura 21. Esquema de la biosíntesis y degradación de los dos principales ECs.

Figura 22. Representación esquemática de la regulación sináptica mediada por la transmisión retrógrada del sEC.

Figura 23. Representación gráfica de la reconfiguración del sEC a lo largo de los estadios del TUA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 24. Representación esquemática del diseño experimental empleado en los estudios realizados.

Figura 25. Representación esquemática de las muestras (resaltadas) de CPF (izquierda) e HPC dorsal (derecha) utilizadas en los análisis de ARNm y densidad de proteína.

RESULTADOS

Figura 26. Efectos del tratamiento con bupropion y fluoxetina en el consumo de alcohol.

Figura 27. Efectos del tratamiento con bupropion y fluoxetina sobre los niveles relativos de ARNm de los genes vinculados al sistema glutamatérgico en la CPF.

Figura 28. Efecto del tratamiento con bupropion y fluoxetina sobre la densidad de proteína de los componentes del sistema glutamatérgico en la CPF.

Figura 29. Efectos del tratamiento con bupropion y fluoxetina sobre los niveles relativos de ARNm de los genes vinculados al sEC en la CPF.

Figura 30. Efecto del tratamiento con bupropion y fluoxetina sobre la densidad de proteína de los componentes del sEC en la CPF.

Figura 31. Efectos del tratamiento con reboxetina sobre el consumo de alcohol durante la recaída.

Figura 32. Efectos del tratamiento con reboxetina sobre los niveles relativos de ARNm de los genes vinculados al sistema glutamatérgico en la CPF.

Figura 32. Efectos del tratamiento con reboxetina sobre los niveles relativos de ARNm de los genes vinculados al sistema glutamatérgico en la CPF.

Figura 33. Efecto del tratamiento con reboxetina sobre la densidad de proteína de los componentes del sistema glutamatérgico en la CPF.

Figura 34. Efectos del tratamiento con reboxetina sobre los niveles relativos de ARNm de los genes vinculados al sistema glutamatérgico en el HPC dorsal.

Figura 35. Efecto del tratamiento con reboxetina sobre la densidad de proteína de los componentes del sistema glutamatérgico en el HPC dorsal.

Figurar 36. Efectos del tratamiento con reboxetina sobre los niveles relativos de ARNm de los genes vinculados al sEC en la CPF.

Figura 37. Efecto del tratamiento con reboxetina sobre la densidad de proteína de los componentes del sEC en la CPF.

Figura 38. Efectos del tratamiento con reboxetina sobre los niveles relativos de ARNm de los genes vinculados al sEC en el HPC dorsal.

Figura 39. Efecto del tratamiento con reboxetina sobre la densidad de proteína de los componentes del sEC en el HPC dorsal.

TABLAS

INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Criterios diagnósticos y severidad del trastorno por uso de alcohol.

Tabla 2. Características de los principales fármacos indicados en el TUA.

Tabla 3. Criterios diagnósticos de la depresión mayor.

Tabla 4. Características de las principales familias de antidepresivos monoaminérgicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 5. Características de los primers utilizados para el ensayo de PCR en tiempo real.

Tabla 6. Características de los anticuerpos primarios utilizados en el análisis de proteína mediante Western blot.

3. RESUMEN Y ABSTRACT

ESTUDIO DE LOS EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON ANTIDEPRESIVOS SOBRE EL CONSUMO DE ALCOHOL

El trastorno por uso de alcohol (TUA) supone un importante problema sanitario con alto coste social y económico nivel global. El TUA se define como un patrón patológico de comportamientos relacionados con el consumo de alcohol, en un continuo de gravedad variable. En este enfoque dimensional, el trastorno adictivo o la adicción al alcohol sería la forma más grave, definiéndose como un trastorno crónico potencialmente recurrente, caracterizado por una compulsión por la búsqueda del alcohol, una pérdida sobre el control de su consumo, así como por la manifestación de un malestar significativo ante la ausencia del mismo implicando profundos cambios en la neurotransmisión y en procesos de neuroplasticidad en distintas regiones cerebrales. Con frecuencia, el TUA cursa con trastornos del estado de ánimo, como la depresión, una condición que, además, contribuye a empeorar el curso de ambas patologías. De este modo, el uso del tratamiento farmacológico antidepresivo es frecuente en el abordaje terapéutico en los pacientes comórbidos. Los sistemas glutamatérgico y endocannabinoide (sEC), así como la neurogénesis adulta del hipocampo, parecen tener una importante participación tanto en la fisiopatología del TUA y la depresión, como en los efectos del tratamiento antidepresivo, si bien el conocimiento sobre estos aspectos neurobiológicos es limitado. La evidencia sobre la eficacia del tratamiento antidepresivo en estos pacientes es, hasta la fecha, inconcluyente, especialmente en lo que respecta a los efectos que este tratamiento tendría sobre aspectos relacionados con el consumo de alcohol. Además, los estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio han mostrado que algunos antidepresivos tendrían repercusiones negativas sobre el consumo de alcohol en la recaída.

De esta forma, nos encontramos frente a la necesidad de buscar posibles tratamientos que no tengan un impacto negativo sobre el consumo y que puedan resultar más seguros en los pacientes con TUA. Así, la presente Tesis Doctoral se compone de 3 estudios independientes. Por un lado, nuestro objetivo empírico busca analizar y comparar los efectos que el tratamiento subcrónico con antidepresivos de distintos mecanismos de acción (ISRS, ISRN y IRND), administrado en un período de

abstinencia, sobre la recaída en el consumo de alcohol en un modelo animal de auto-administración basado en el efecto de privación de alcohol (*alcohol deprivation effect*, ADE). Además, buscamos estudiar las posibles alteraciones que el tratamiento con antidepresivos pudiera tener sobre el sEC y el sistema glutamatérgico en estructuras cerebrales vulnerables, siendo dos de los sistemas que pueden estar relacionados con la conducta de auto-administración de alcohol en la recaída (estudios 1 y 2). Finalmente, el tercer estudio tiene como objetivo teórico realizar una revisión sobre la evidencia clínica y preclínica disponible en relación a la eficacia del tratamiento antidepresivo en el TUA, analizando la implicación de la neurogénesis hipocampal como un mecanismo de neuroplasticidad potencialmente relevante en los efectos que el tratamiento antidepresivo tendría sobre el consumo de alcohol, con el fin de establecer nuevas hipótesis para futuros trabajos de investigación (estudio 3).

Los resultados del primer y segundo bloque experimental indican que los animales que recibieron tratamiento con fluoxetina (ISRS) incrementaron su consumo de alcohol durante la recaída, mientras que los animales que recibieron bupropion (IRND) no mostraron alteraciones en el consumo. Por otro lado, observamos que los animales que recibieron tratamiento con reboxetina (ISRN) mostraron, de forma similar a lo observado con la fluoxetina, un aumento en el consumo de alcohol en la recaída. Además, observamos que los animales que recibieron tratamiento con fluoxetina y reboxetina mostraron una reducción en la expresión de las subunidades N1 y A1 de los receptores NMDA y AMPA, así como una disminución de la enzima DAGL en la CPF en comparación con los animales que recibieron vehículo, mientras que los animales que habían recibido fluoxetina mostraban un aumento muy acusado en los niveles de ARNm y de densidad de proteína del receptor CB2. Finalmente, observamos que los animales que recibieron tratamiento con reboxetina mostraban, de forma similar, una reducción en la expresión de la subunidad N1 del receptor NMDA y, así como una disminución del receptor mGlu5 y de la enzima DAGL, tanto en la CPF como en el HPC.

En el tercer estudio, en este caso en el plano teórico y en base a la evidencia clínica y preclínica disponible, realizamos una aproximación hacia el papel que la neurogénesis adulta en el HPC podría desempeñar como mecanismo mediador en la recaída en el consumo de alcohol y/o en la eficacia del tratamiento antidepresivo.

La integración de estos estudios nos permite concluir que los patrones de consumo de alcohol mostrados por los animales durante la recaída difieren en función del mecanismo de acción del antidepresivo utilizado. Así, observamos un aumento mantenido en el consumo de alcohol en la recaída en los animales que recibieron tratamiento con ISRS y con ISRN, no siendo así en los que recibieron tratamiento con IRDN. En conjunto, estos hallazgos preclínicos podrían ser útiles para mejorar el tratamiento de pacientes con TUA en los que la motivación por retomar el consumo tuviera un mayor componente afectivo/emocional, sobre el cual el antidepresivo podría ejercer su efecto terapéutico. Además, concluimos que, si bien los animales sometidos a los distintos tratamientos antidepresivos muestran algunos cambios similares en el sEC y el sistema glutamatérgico, indicativos de una desinhibición del sEC y una excitabilidad glutamatérgica, también encontramos algunos cambios específicos en los animales que recibieron tratamiento con fluoxetina y reboxetina que podrían subyacer a los patrones de consumo observado en la recaída de estos animales. Esto podría implicar alteraciones en diferentes procesos de neuroplasticidad y, en este sentido, una potencial fuente de investigación de cara al futuro sería el estudio empírico de la neurogénesis adulta en el HPC como mecanismo mediador en los efectos que el tratamiento antidepresivo ejercería sobre la recuperación del consumo de alcohol.

STUDY OF THE EFFECTS OF ANTIDEPRESSANT TREATMENT ON ALCOHOL CONSUMPTION

Alcohol use disorder (AUD) is an important health problem with high social and economic costs at the global level. AUD is defined as a pathological pattern of behavior related to alcohol consumption, in a continuum of variable severity. In this dimensional approach, the addictive disorder or alcohol addiction would be the most severe form, defining itself as a chronic disorder potentially recurrent, characterized by a compulsion to search for alcohol, a loss of control over its consumption, as well as by the manifestation of a significant negative emotional state in the absence of alcohol, implying profound changes in neurotransmission and in neuroplasticity processes in different brain regions. AUD often leads to mood disorders, such as depression, a condition that also contributes to worsening the course of both conditions. Thus, the use of antidepressant drug treatment is common in the therapeutic approach in comorbid patients. The glutamatergic and endocannabinoid (sEC) systems, as well as the adult neurogenesis of the hippocampus, appear to have an important role both in the pathophysiology of TUA and depression, and in the effects of antidepressant treatment, although knowledge of these neurobiological aspects is limited. The evidence on the efficacy of antidepressant treatment in these patients is, to date, inconclusive, especially with regard to the effects this treatment would have on aspects related to alcohol consumption. In addition, previous studies carried out in our laboratory have shown that some antidepressants would have a negative impact on alcohol consumption in relapse.

In this way, we are faced with the need to check the efficacy of possible treatments that do not have a negative impact on consumption and that may be safer in patients with TUA. Thus, this Doctoral Thesis is made up of 3 independent studies. On the one hand, our empirical objective seeks to analyze and compare the effects that subchronic treatment with antidepressants of different mechanisms of action (SSRIs, SNRIs and NDRIs) have, administered in a period of abstinence, on alcohol relapse in an animal model of self-administration based on alcohol deprivation effect (ADE). In addition, we aim to study the possible alterations that treatment with antidepressants may have on the sEC and glutamatergic system in vulnerable brain

structures, being two of the systems that may be related to alcohol self-administration behavior in relapse (studies 1 and 2). Finally, the third study has the theoretical objective of reviewing the available clinical and preclinical evidence regarding the efficacy of antidepressant treatment in the AUD, analyzing the implication of hippocampal neurogenesis as a potentially relevant mechanism of neuroplasticity in the effects that antidepressant treatment would have on alcohol consumption, in order to establish new hypotheses for future research work (study 3).

Results from the first and second experimental blocks indicate that animals treated with fluoxetine (SSRI) increased their alcohol consumption during relapse, while animals treated with bupropion (NDRI) showed no alterations in consumption. On the other hand, we observed that animals treated with reboxetine (ISRN) showed, similar to that observed with fluoxetine, an increase in alcohol consumption in relapse. In addition, we observed that animals treated with fluoxetine and reboxetine showed a reduction in the expression of the N1 and A1 subunits of the NMDA and AMPA receptors, as well as a decrease in the DAGL enzyme in the CPF compared to animals fed a vehicle, while animals fed fluoxetine showed a marked increase in the mRNA and protein density levels of the CB2 receptor. Finally, we observed that animals treated with reboxetine similarly showed a reduction in the expression of the N1 subunit of the NMDA receptor and a decrease in the mGlu5 receptor and the DAGL enzyme in both CPF and HPC.

In the third study, in this case on a theoretical level and based on the available clinical and preclinical evidence, we made an approximation towards the role that adult neurogenesis in HPC could play as a mediating mechanism in the relapse in alcohol consumption and/or in the efficacy of antidepressant treatment.

The integration of these studies allows us to conclude that the patterns of alcohol consumption shown by the animals during relapse differ depending on the mechanism of action of the antidepressant used. Thus, we observed a sustained increase in alcohol consumption during relapse in animals treated with SSRIs and SNRIs, but not in those treated with NDRIs. Taken together, these preclinical findings may be useful in improving the treatment of patients with AUD in whom the motivation to resume use had a greater affective/emotional component, on which the antidepressant might exert its therapeutic effect. In addition, we concluded that,

although the animals subjected to different antidepressant treatments show some similar changes in the sEC and glutamatergic system, indicating a disinhibition of the sEC and a glutamatergic excitability, we also found some specific changes in the animals that received treatment with fluoxetine and reboxetine that could underlie the consumption patterns observed in the relapse of these animals. This could imply alterations in different neuroplasticity processes and, in this sense, a potential source of research for the future would be the empirical study of adult neurogenesis in HPC, as a mediating mechanism in the antidepressants-induced effects on alcohol relapse.

4. INTRODUCCIÓN

4.1 El trastorno por uso de alcohol (TUA)

4.1.1 Epidemiología y criterios diagnósticos

Desde que se empezaran a producir las primeras bebidas fermentadas, el alcohol ha formado parte de la cultura de las diversas civilizaciones humanas a lo largo de la historia. El consumo de alcohol ha sido tan popular y se ha extendido tanto que incluso lo encontramos asociado a costumbres y tradiciones fuertemente arraigadas en diferentes culturas, algunas de las cuales se han mantenido hasta la actualidad. Según el informe más reciente de la organización mundial de la salud (WHO, 2018), casi la mitad de la población mundial habría consumido alcohol durante los 12 meses previos a la recogida de datos, y se estima, a nivel global, un consumo promedio de 6,4 litros de alcohol puro per cápita en el transcurso del año 2016, cifra que se elevaría a 15,1 litros excluyendo a la población abstemia. No obstante, estos niveles de consumo presentarían grandes diferencias entre países, siendo quizás Europa uno de los focos de mayor promedio de consumo. Si bien el consumo de alcohol constituye una parte innegable del ocio y la interacción social, lamentablemente, no está exento de importantes consecuencias económicas, sociales y sanitarias.

El impacto del alcohol en la salud abarca desde las consecuencias indirectas derivadas de su consumo, de entre las cuales los accidentes de tráfico serían quizás las que tuvieran un impacto más significativo, hasta patologías directamente asociadas al efecto tóxico del alcohol sobre diferentes tejidos y órganos, como enfermedades cardiovasculares, hepáticas y psiquiátricas. El impacto socio-económico-sanitario derivado del consumo de alcohol abarca un amplio espectro. De entre las patologías psiquiátricas asociadas cabe destacar trastornos como la depresión, los trastornos de ansiedad, y el trastorno por uso de alcohol (TUA). Los datos del año 2016 estiman que un 5,1% de la población mundial padecería un TUA (WHO, 2018). Concretamente, y posiblemente en relación con los datos de consumo de alcohol disponibles, Europa sería la región que mostraría las estimaciones más preocupantes, con una prevalencia del trastorno de un 14,8% en hombres y del 3,5% en mujeres. Finalmente, cabe señalar que, según este mismo informe, el 5,3% del total de las muertes en 2016 estuvieron relacionadas con el abuso de alcohol (WHO, 2018).

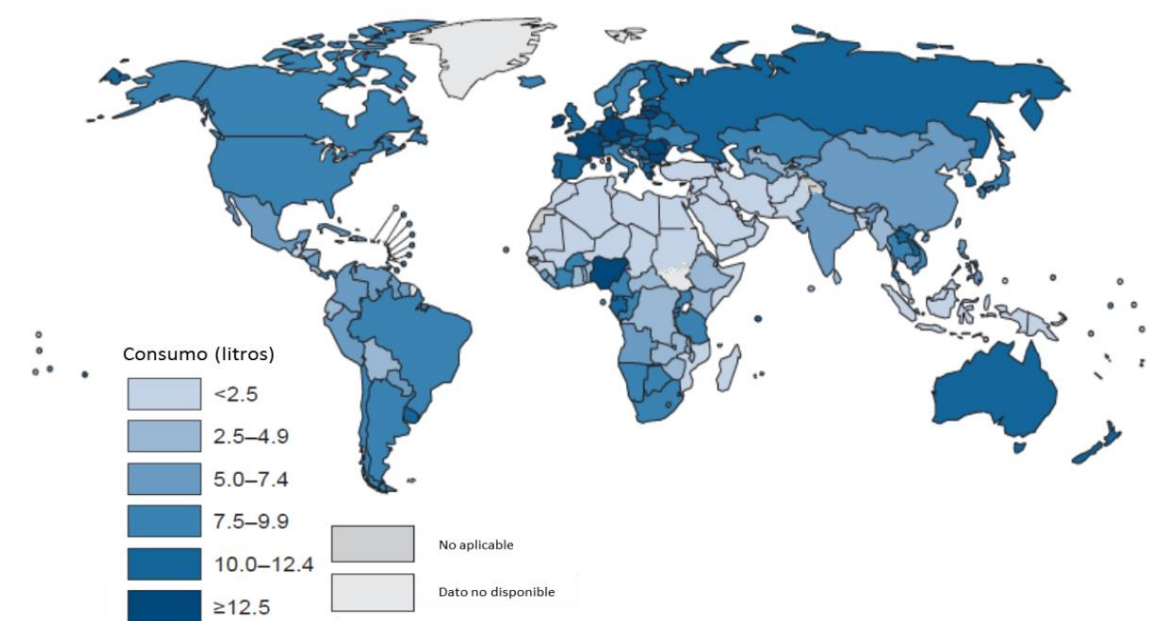


Figura 1. Datos mundiales del consumo de alcohol puro per cápita durante 2016. Modificado de WHO 2018.

Desde 1980 hasta el año 2013, fecha de publicación de la 5ª edición del manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (APA, 2014), el TUA se contemplaban bajo los criterios de las versiones inmediatamente anteriores de este manual como dos diagnósticos mutuamente excluyentes: el abuso de alcohol y la dependencia alcohólica. Diferentes estudios cuestionaron dicha separación en el diagnóstico (Saha et al., 2006; Proudfoot et al., 2006; Harford et al., 2009), lo que en parte impulsó que pasaran a ser descritos de forma que fuera posible abarcar su complejidad de una forma más eficiente. Así, el DSM V (APA, 2014) integraría ambas condiciones en un solo espectro continuo de severidad variable, incluyendo 11 criterios diagnósticos. La severidad del TUA, en función del número de criterios manifestados en un plazo de 12 meses, comprende desde un trastorno leve a uno severo. Finalmente, se considerará que el trastorno presenta una remisión inicial cuando no se han manifestado ninguno de los síntomas (con la excepción del criterio 4, ver Tabla 1) en un plazo de 3 meses. Además, se considerará una remisión continuada cuando la remisión inicial se prolongue durante al menos 12 meses (Tabla 1).

1. Se consume alcohol con frecuencia en cantidades superiores o durante un tiempo más prolongado del previsto.		
2. Existe un deseo persistente o esfuerzos fracasados de abandonar o controlar el consumo de alcohol.		
3. Se invierte mucho tiempo en las actividades necesarias para conseguir alcohol, consumirlo o recuperarse de sus efectos.		
4. Ansias o un poderoso deseo o necesidad de consumir alcohol.		
5. Consumo recurrente de alcohol que lleva al incumplimiento de los deberes fundamentales en el trabajo, la escuela o el hogar.		
6. Consumo continuado de alcohol a pesar de sufrir problemas sociales o interpersonales persistentes o recurrentes, provocados o exacerbados por los efectos del alcohol.		
7. El consumo de alcohol provoca el abandono o la reducción de importantes actividades sociales, profesionales o de ocio.		
8. Consumo recurrente de alcohol en situaciones en las que provoca un riesgo físico.		
9. Se continúa con el consumo de alcohol a pesar de saber que se sufre un problema físico o psicológico persistente o recurrente probablemente causado o exacerbado por el alcohol.		
10. Tolerancia, definida por alguno de los siguientes hechos:		
a. Una necesidad de consumir cantidades cada vez mayores de alcohol para conseguir la intoxicación o el efecto deseado.		
b. Un efecto notablemente reducido tras el consumo continuado de la misma cantidad de alcohol.		
11. Abstinencia, manifestada por alguno de los siguientes hechos:		
a. Presencia del síndrome de abstinencia característico del alcohol		
b. Se consume alcohol (o alguna sustancia muy similar, como una benzodiacepina) para aliviar o evitar los síntomas de abstinencia.		
2-3 criterios	4-5 criterios	≥6 criterios
Leve	moderado	severo

Tabla 1. Criterios diagnósticos y severidad del trastorno por uso de alcohol. De APA, 2014.

4.1.2 Farmacología del Alcohol

4.1.2.1 Farmacocinética

El alcohol etílico o etanol se obtiene de la fermentación anaerobia de los hidratos de carbono y presenta una configuración estructural que le confiere una alta capacidad reactiva. La molécula de alcohol se compone de una cadena de dos carbonos y un grupo hidroxilo, lo que implica una polarización ambigua y un potencial elevado de interacción con otras moléculas. Esto, junto de su pequeño tamaño y bajo peso (46,06 g / mol), permiten al alcohol distribuirse y reaccionar en multitud de tejidos y fluidos del organismo.

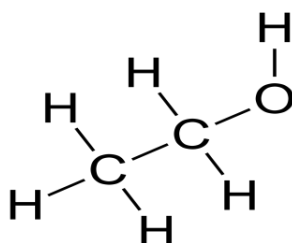


Figura 2. Estructura molecular del etanol

El alcohol se consume principalmente por la vía oral. Una vez liberado en el organismo, durante la etapa de absorción, el alcohol alcanzará el torrente sanguíneo. Una pequeña cantidad podría ser absorbida en la cavidad bucal donde fuera liberado, pero la mayor parte pasará a la circulación atravesando por difusión simple el estómago (aproximadamente el 20%) y el intestino delgado (el 80%). La velocidad con la que se produce depende de diversos factores, como una elevada concentración de alcohol, que podrían acelerar su absorción (Roine et al., 1993), o la presencia de alimentos en el estómago, que la ralentizaría (Jones et al., 1997).

Cuando alcanza el torrente sanguíneo, el alcohol es distribuido a lo largo del sistema circulatorio, pasando desde el corazón a los diferentes órganos y fluidos, pudiendo atravesar libremente las barreras hematoencefálica y placentaria. Al disolverse mejor en medios acuosos que lipídicos, la distribución del alcohol se ve influenciada por la proporción de agua y grasa corporal (Watson, 1989). Además existen otros parámetros relacionados con la circulación sanguínea, como las

afecciones circulatorias, la temperatura, o la actividad muscular, que alterarían la distribución del alcohol (Norberg et al., 2003).

Aunque una pequeña parte del proceso metabólico del alcohol puede darse en el estómago, el corazón, los riñones e incluso el cerebro, la mayor parte de su metabolismo tiene lugar en el hígado. El metabolismo del alcohol se produce principalmente por oxidación, transformándose en acetaldehído, fundamentalmente por medio de la actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) presente en el citosol celular. Esta enzima emplea el cofactor nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) que se verá reducido por dos hidrógenos en la reacción de oxidación del alcohol. Existen numerosas subfamilias de ADH en función de las diferentes subunidades que las componen, están agrupadas en 5 clases que presentan diferentes propiedades cinéticas (Edenberg y Bosron, 2018). Además, numerosos estudios han identificado isoformas específicas de esta enzima que podrían conferir un papel protector frente al TUA (revisado en Edenberg y McClintick, 2018).

Principalmente a nivel hepático existen otros dos sistemas enzimáticos vinculados con el metabolismo del alcohol, sobre todo cuando este se encuentra en concentraciones elevadas que saturarían la actividad de ADH. Uno de ellos es el sistema microsomal de oxidación del etanol (MEOS), localizado en el retículo endoplasmático de las células, denominado P450 CYP2E1. Este sistema genera acetaldehído y agua a partir de alcohol y el cofactor nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), es inducible por el alcohol, y vería incrementada su acción metabólica ante un consumo crónico (Lieber y DeCarli 1968; 1970; Tsutsumi et al., 1993). Finalmente, el tercer sistema involucrado en el metabolismo del alcohol sería el complejo de la enzima catalasa y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La reacción de oxidación de la catalasa junto al peróxido de hidrógeno generará acetaldehído y agua (Figura 3). Debido a que esta reacción puede tener lugar no solo a nivel hepático, sino que además sería la principal ruta metabólica del alcohol a nivel cerebral (Cohen et al., 1980), este sistema ha ganado especial relevancia en el papel del metabolismo del alcohol en aspectos directamente ligados a la adicción, como la motivación por el consumo o la generación de tolerancia y del valor hedónico del alcohol (Deng y Deitrich, 2008).

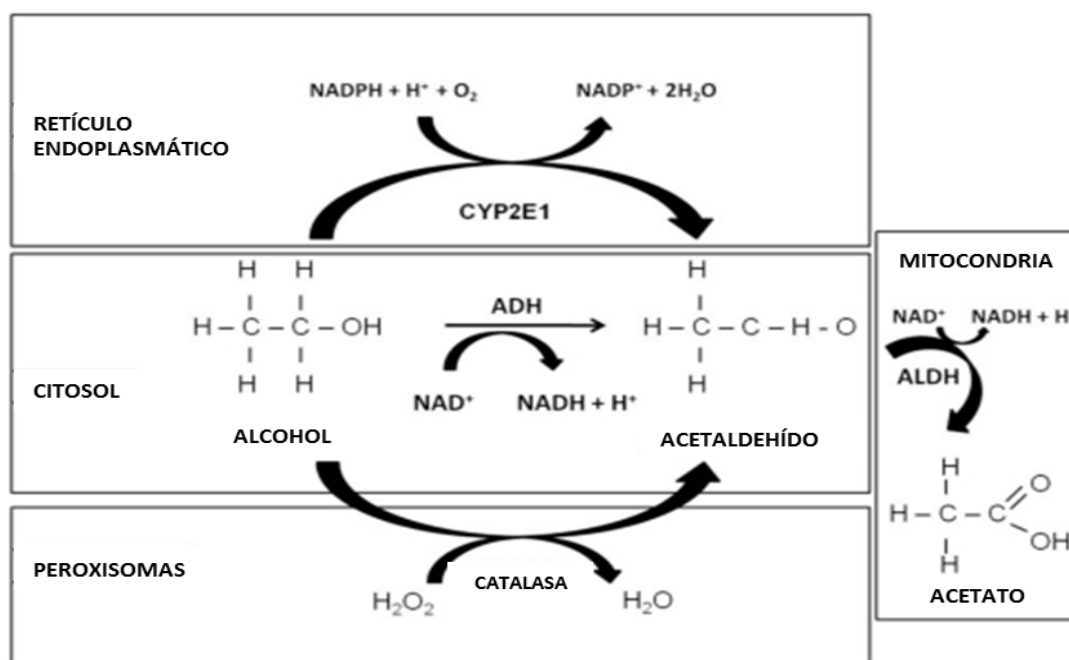


Figura 3. Principales vías metabólicas del alcohol. Modificado de Zakhari, 2006

Las rutas metabólicas mencionadas generarán acetaldehído, una molécula potencialmente tóxica para el organismo. De hecho, la concentración de este metabolito desempeñaría un papel fundamental en el desarrollo del TUA (Lindros y Eriksson, 1975; Agarwal y Goedde, 1989). El acetaldehído es metabolizado, principalmente a nivel hepático en la mitocondria por la oxidación la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) y el cofactor NAD, transformándose en acetato. Esta reacción se produce de forma eficiente, por lo que los niveles de acetaldehído serán frecuentemente bajos, no obstante, los patrones de consumo pueden inducir adaptaciones metabólicas en la actividad de esta enzima, siendo menor su actividad ante un consumo crónico, lo que generará mayores niveles de acetaldehído en pacientes con TUA (Cederbaum, 2012). Además, de forma similar a las diferentes ADHs, las ALDHs pueden presentar diferentes perfiles cinéticos en función de su pertenencia a una de las tres grandes familias de estas enzimas (Jackson et al., 2011). Por consiguiente, también existen isoformas de esta enzima que han mostrado conferir un papel protector contra los TUA (Edenberg y McClintick, 2018).

El producto metabólico del acetaldehído es el acetato, que es metabolizado fuera del hígado por oxidación y transformado en acetil coenzima A, que posteriormente formará parte de la biosíntesis de lípidos y colesterol en la mitocondria

de las células de múltiples tejidos. El alcohol es eliminado principalmente tras el proceso metabólico que se ha descrito, aunque una pequeña proporción puede eliminarse antes por evaporación en los pulmones, por excreción en la orina o por transpiración en sudor. Dada la complejidad del proceso metabólico del alcohol, su ritmo de eliminación dista mucho de ser una constante. Así, se ha descrito que la velocidad de eliminación se ve condicionada, entre otras variables, por la concentración del mismo (Salaspuro y Lieber, 1978).

4.1.2.2 Farmacodinamia

El alcohol presenta múltiples interacciones en órganos y sistemas, como el sistema nervioso, endocrino, inmune y cardiovascular. Concretamente, a nivel del sistema nervioso central (SNC), el alcohol ejerce fundamentalmente una acción depresora a nivel celular. Este efecto vendría mediado por la acción directa e indirecta sobre numerosos sistemas de neurotransmisión, comprometiendo a diferentes circuitos cerebrales implicados en el procesamiento del refuerzo, la formación de hábitos, la regulación del estrés o la toma de decisiones. Como veremos en adelante, dichas alteraciones conformarán el marco neurobiológico del TUA (Cui et al., 2012; Vengeliene et al., 2008).

El alcohol actúa sobre multitud de receptores, canales iónicos y proteínas de señalización intracelular, pero con consecuencias diferentes en función de la cronicidad del consumo (Lovinger y Roberto, 2013). Además, dependiendo de su concentración existen diferencias en la afinidad por las diferentes dianas sobre las ejercerá su acción y en los efectos derivados de dicha interacción (Marin y Morais-Silva, 2017, representadas en la Figura 5).

De entre estos mecanismos, la acción del alcohol sobre el sistema de señalización del ácido γ -aminobutírico (GABA), el principal neurotransmisor inhibitor del SNC es quizás una de las más estudiadas. Así se ha observado que el alcohol alteraría la señal GABAérgica a través de su capacidad de activar los receptores GABA presentes en la membrana. Dentro de la heterogénea familia de estos receptores, el receptor GABA_A ha sido el que más se ha vinculado a los efectos del alcohol (Liang y Olsen, 2014). Esta familia de receptores pertenece a la categoría de canales iónicos

activables por ligando y se caracterizan por su acción rápida. Su estructura pentamérica se compone de la combinación 5 de las 19 siguientes subunidades; $\alpha 1-6$, $\beta 1-3$, $\gamma 1-3$, δ , ϵ , θ , π , y $\rho 1-3$. La heterogénea recombinación de estas subunidades ha sido catalogada dentro de tres categorías (Olsen y Sieghart, 2008). Concretamente, el alcohol muestra una alta afinidad por las isoformas del receptor que presentan las subunidades δ y $\beta 3$ (Olsen, 2018). La activación de estos receptores por el neurotransmisor GABA conlleva un cambio conformacional en su estructura, lo que aumenta la permeabilidad al Cloro (Cl^-) de las células. Dado que el potencial de reposo celular presenta una menor concentración de Cl^- en el interior de la célula que en el exterior, un aumento de la permeabilidad permitirá la entrada del mismo, resultando en un estado de hiperpolarización o inhibición neural. El alcohol modula esta interacción, potenciándola, aumentando la permeabilidad al Cl^- desencadenada por la activación del receptor (Figura 4). Además, la actividad de este receptor se verá influenciada por la cronicidad y los patrones del consumo de alcohol (Liang y Olsen, 2014; Roberto y Varodayan, 2017).

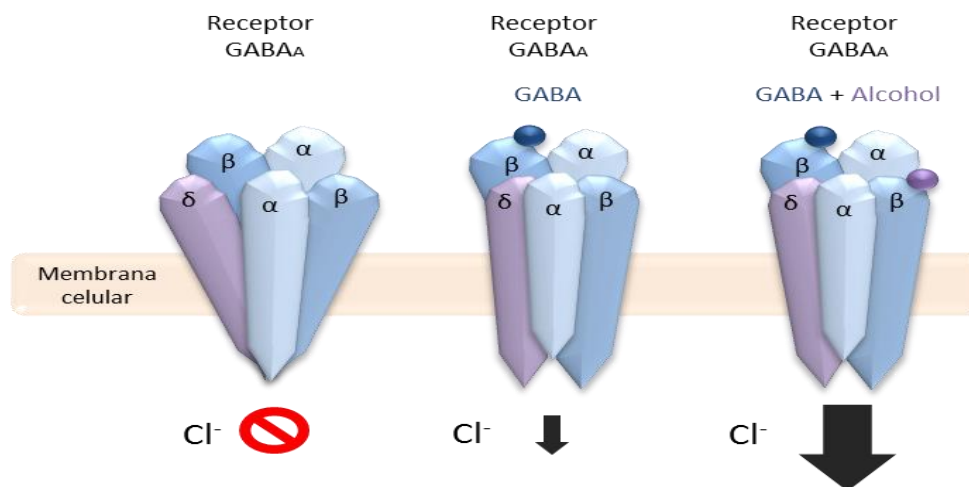


Figura 4. Interacción de la molécula de alcohol en la activación del receptor GABA_A.

El potencial efecto depresor que el alcohol ejerce sobre el SNC está ligado a su capacidad de potenciar un sistema inhibitorio, como la transmisión GABAérgica, pero también estará mediado por la desactivación de sistemas excitatorios. El ácido glutámico o glutamato es el principal neurotransmisor excitador del SNC y, como se describe en mayor detalle en adelante, su señalización ha mostrado jugar un papel fundamental en la fisiología del TUA (Gass y Olive, 2008; Kalivas, 2009), así como en los

procesos de plasticidad sináptica que subyacen al aprendizaje y la adaptación de los organismos a su entorno (Abraham, 2008).

En general, el alcohol actuará inhibiendo la actividad de los principales receptores de este sistema. De entre estos, el más sensible al alcohol es la familia del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA). Este receptor pertenece a la categoría de canales iónicos activables por ligando. Su formación en tetrámeros está compuesta por la recombinación de diferentes subunidades; la subunidad N1 considerada la fundamental del receptor, y las subunidades moduladoras N2A-D y N3A-B. Los receptores de NMDA con diferentes composiciones de subunidades muestran distinta regulación, distribución, y propiedades, así como características funcionales y farmacológicas heterogéneas (Yamakura y Shimoji, 1999). Así, la sensibilidad de estos receptores ante la molécula de alcohol viene determinada por la configuración de sus subunidades, siendo las isoformas N1/N2A y N1/N2B las que mostrarán una mayor sensibilidad ante ésta (Möykkynen y Korpi, 2012). Estos receptores muestran permeabilidad al sodio (Na^+), al potasio (K^+) y al calcio (Ca^{2+}), por consiguiente, al ser activados tendrá lugar un cambio en su estructura conformacional, lo que permitirá que, por gradiente de concentración, estos iones pasen al interior de la célula. En ausencia de alcohol, este proceso contribuirá a una despolarización o excitación neural, por el contrario, la interacción de la molécula de alcohol obstaculizará este proceso, evitando que los receptores NMDA aumenten la permeabilidad iónica y que tenga lugar la despolarización (Wright et al., 1996). De forma similar a los receptores GABA_A , la cronicidad del consumo de alcohol y otras condiciones propias del ciclo adictivo darán lugar a cambios en la sensibilidad y la distribución de los receptores NMDA (Nagy, 2008; Roberto y Varodayan, 2017). Las alteraciones en receptor NMDA en relación al TUA se abordarán en mayor detalle en adelante.

Otro de los receptores glutamatérgicos que ha mostrado ser vulnerable a los efectos de alcohol es el receptor α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA). Estos receptores, al igual que los NMDA, pertenecen a la categoría de canales iónicos activables por ligando, están constituidos por los diferentes ensamblajes de 4 subunidades (A1–4). Son permeables al K^+ y Na^+ , si bien varias de sus isoformas no lo serían tanto para el Ca^{2+} como los receptores NMDA, y están caracterizados por mediar en la señal de neurotransmisión excitatoria rápida de la mayor parte de las sinapsis

del SNC (Stawski et al., 2010). La molécula de alcohol actúa obstaculizando la activación de estos receptores de forma similar a la observada anteriormente, reduciendo la permeabilidad de la membrana celular a la entrada de iones que permitirían la despolarización. A diferencia de los NMDA, los receptores AMPA mostrarían una respuesta al alcohol ante altas concentraciones, presentando cambios en su funcionalidad y distribución cuando el alcohol ejerce su efecto de forma crónica (Goodwani et al., 2017; Roberto y Varodayan, 2017). Igualmente, estos aspectos se abordarán posteriormente.

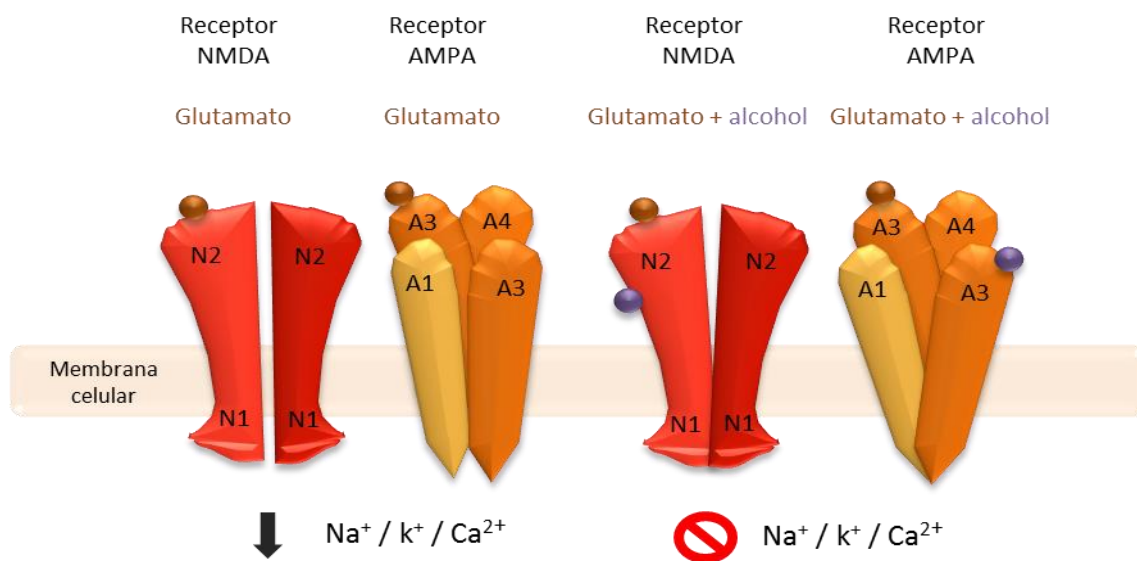


Figura 5. Interacción de la molécula de alcohol en la activación de los receptores NMDA y AMPA.

Existen además otras potenciales dianas de la molécula del alcohol a nivel del SNC. La molécula de alcohol ha mostrado también una afinidad por los receptores de glicina. Junto con el GABA la glicina mediaría las señales inhibitorias a nivel del SNC. Los receptores de glicina están distribuidos a nivel postsináptico, constituyen pentámeros compuestos por las subunidades $\alpha 1-4$ y β , están vinculados a un canal iónico y su activación aumenta la permeabilidad al cloro, desencadenando una hiperpolarización neural (Lynch, 2009). La composición de las subunidades de estos receptores también condiciona la afinidad de la molécula de alcohol por los mismos, siendo los que presentan la subunidad $\alpha 1$ los que presentarían una mayor sensibilidad ante bajas concentraciones de alcohol (Sebe et al., 2003). Concretamente, el alcohol potencia la activación de estos receptores ante su activación por el neurotransmisor glicina, aumentando la permeabilidad al Cl^- (Eggers y Berger, 2004).

Por otro lado, el alcohol altera la señal colinérgica por medio de la interacción con los receptores nicotínicos de acetilcolina (nACh). Estos pertenecen a la categoría de canales activables por ligando, son permeables al Na^+ , al K^+ y al Ca^{2+} , y predominan en el espacio presináptico, lo que les confiere una función moduladora de la liberación de neurotransmisores. Conforman estructuras pentaméricas fruto de la recombinación de 19 posibles subunidades (Fasoli y Gotti, 2015). A bajas concentraciones, el alcohol tiene la capacidad de actuar como un co-agonista en la interacción de la nicotina y la acetilcolina en la activación de los receptores que presentan las subunidades $\alpha 4\beta 2$ (Marszalec et al., 1999).

Otro de los principales efectos del alcohol viene determinado por su capacidad para alterar la señalización de la 5-hidroxitriptamina (5-HT), también denominada serotonina, una de las principales aminas biógenas asociada a diferentes funciones del SNC. Existe una gran variedad de tipos de receptores para 5-HT, y el alcohol muestra una afinidad especialmente alta por el único que pertenece a la categoría de los canales iónicos activables por ligando, el receptor 5-HT₃. La activación de estos receptores regula la apertura de canales iónicos permeables principalmente al Na^+ y al K^+ , produciendo la despolarización neural y la consiguiente liberación de neurotransmisores (Reeves y Lummis, 2002). El alcohol actúa como un potenciador de la activación de estos receptores, aumentando el flujo de iones, con especial afinidad por los que presentan una combinación homo-pentamérica de sus subunidades, los 5-HT_{3A} (Hayrapetyan et al., 2005).

El alcohol actúa además sobre los 3 diferentes canales de iones activables por voltaje, los canales de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} . A diferencia de los anteriormente mencionados, que eran activados por ligandos específicos, estos canales permitirán el tránsito de iones como respuesta a un cambio en el potencial de membrana (Moran et al., 2015). Concretamente, el alcohol actúa inhibiendo la apertura de los canales de Ca^{2+} de tipo L (Zucca y Valenzuela, 2010), mientras que potenciaría la apertura de los canales de K^+ , aumentando la sensibilidad de estos al cambio de potencial de membrana debido a los niveles intracelulares de Ca^{2+} (Liu et al., 2008). Finalmente, a concentraciones muy elevadas induciendo un efecto anestésico, el alcohol actúa inhibiendo la apertura de los canales de Na^+ (Krylov, et al., 2000).

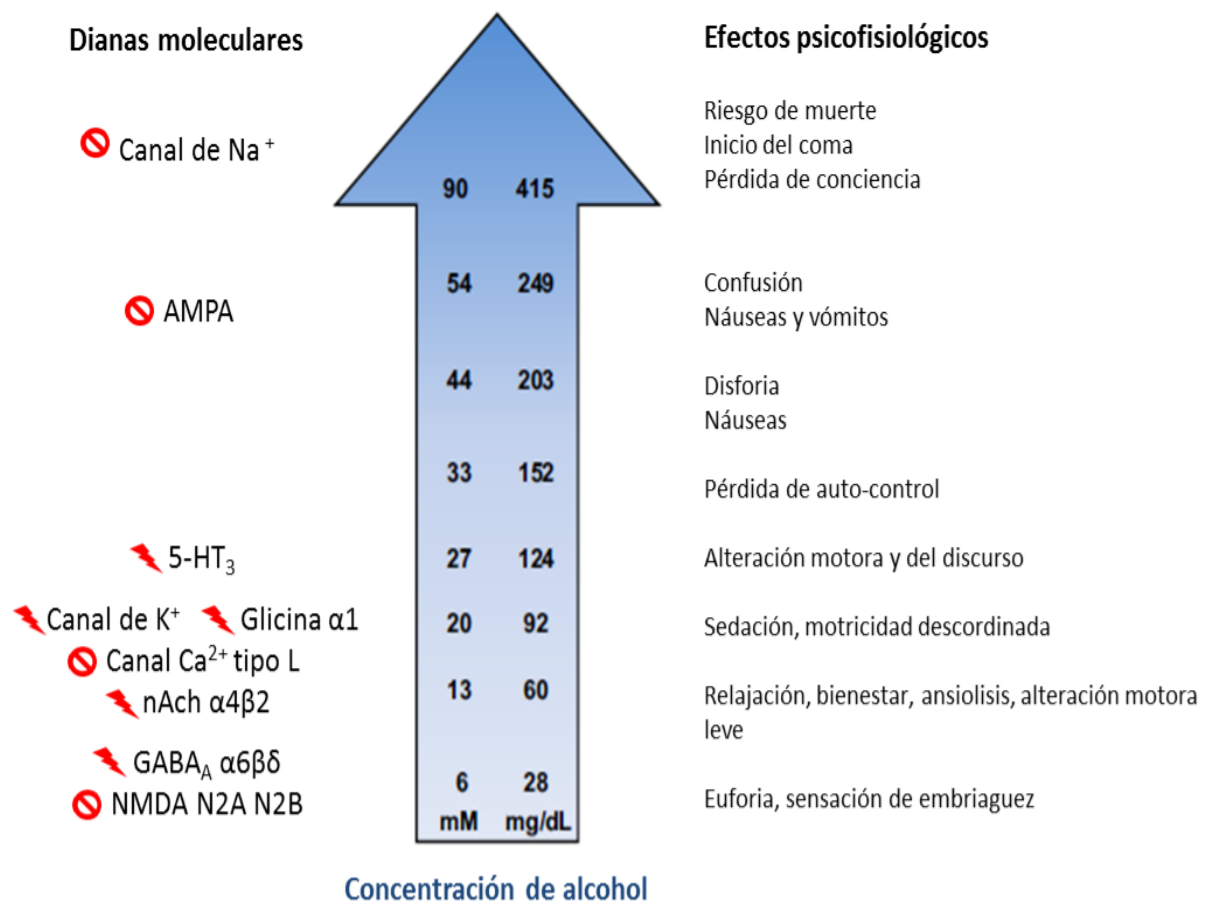


Figura 6. Esquema de las principales dianas moleculares del alcohol ante diferentes concentraciones y los efectos psicofisiológicos asociados. Modificado de Marin y Morais-Silva, 2017.

4.1.3 Neurobiología del TUA

El TUA, como se ha comentado anteriormente, se definen como un patrón patológico de comportamientos relacionados con el consumo de alcohol, en un continuo de gravedad variable. En este enfoque dimensional, el trastorno adictivo o la adicción al alcohol sería la forma más grave, definiéndose como un trastorno crónico potencialmente recurrente, caracterizado por una compulsión por la búsqueda del alcohol, una pérdida sobre el control de su consumo, así como por la manifestación de un malestar significativo ante la ausencia del mismo (Koob y Volkov, 2016). Estos aspectos se verían reflejados en una serie de síntomas o criterios diagnósticos (Tabla 1).

Si bien la fisiopatología de los trastornos por uso de sustancias es aún objeto de estudio, actualmente se barajan diferentes teorías que englobarían el desarrollo de este complejo proceso desde distintas perspectivas, de entre las cuales, la aproximación neurobiológica será la más relevante desde el punto de vista de este trabajo. Existen múltiples teorías que tratan de explicar la transición hasta un estado patológico de consumo. La implementación de estas teorías permite la construcción de modelos que tratan de integrar una serie de supuestos o hipótesis en un marco de coherencia.

Actualmente, las principales teorías de la adicción se encuentran integradas dentro de un modelo que trata de asociar diferentes estadios de la adicción con circuitos neurobiológicos y funciones cerebrales específicas (Koob y Volkow, 2009, representado en Figura 7). Según este modelo, el proceso adictivo atravesaría 3 etapas ligadas a 3 circuitos neurobiológicos interconectados que, sucedidas consecutivamente, consolidarían el ciclo adictivo;

1. Consumo/Intoxicación: Durante esta primera etapa destaca principalmente el valor hedónico o reforzante de la sustancia, es decir, la capacidad que tiene la sustancia para activar el sistema de recompensa, consiguiendo repetir e incrementar la conducta asociada al consumo de la misma.

Desde una perspectiva de la circuitería a nivel neurobiológico, este estadio se ha vinculado con la activación del sistema límbico. Dentro de estos circuitos

resulta especialmente relevante la vía meso-cortico-límbica del neurotransmisor dopamina, que ha sido identificada como el sistema de recompensa cerebral. La señalización de este neurotransmisor se ha postulado, a través de múltiples estudios, como una piedra angular sobre la que se cimentaría el proceso adictivo (Chen et al., 2017), no obstante, se han descrito otros sistemas de neurotransmisión relevantes en este proceso, como la señal 5-HT (Belmer et al., 2016) y la señalización regulada por opioides endógenos (Laurent et al., 2014). La señalización de los neurotransmisores implicados en el valor hedónico de la sustancia actuaría en sus terminales neurales del estriado ventral, concretamente en el núcleo accumbens (NAc) (Everitt et al., 2008).

Desde un enfoque teórico, esta etapa contemplaría el concepto de refuerzo condicionado, por el cual un estímulo neutro sería emparejado con otro reforzante, adquiriendo el primero propiedades reforzantes en sí mismo. Además, este fenómeno consolidaría el concepto denominado sensibilización del incentivo, definido como el estado motivacional enfocado en la búsqueda de estimulación reforzante en base a una respuesta psicofisiológica interna y los estímulos asociados a esta (Robinson y Berridge 1993).

2. Abstinencia/afecto negativo: Durante este estadio predominan una serie de síntomas emocionales y motivacionales característicos como la irritabilidad, un bajo estado anímico o una falta de interés por reforzadores naturales debidos a la ausencia de la sustancia. Estos efectos estarían asociados a una contra-reacción del sistema ante los efectos agudos de la sustancia que tienen lugar en la primera etapa, que se manifestarían como una señalización opuesta a la inducida inicialmente.

En este momento la amígdala extendida, estructura neural compuesta por el núcleo central de la amígdala, el núcleo basal de la estría terminal y la superficie del NAc (Heimer y Alheid, 1991) y el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal serían las regiones cerebrales que mostraría mayor relevancia, sobre todo debido a su papel modulador del estrés mediante la señalización del factor liberador de

corticotropina (CRF) (Koob y Kreek, 2007). Además, de forma generalizada, la señalización reforzante de neurotransmisores impulsada en el primer estadio se verá inhibida o reducida (Belmer et al., 2016; Melis et al., 2005).

Estos procesos vendrían enmarcados en la teoría de los procesos oponentes y el anti-refuerzo, que postularía que el sistema dispondría de la capacidad de antagonizar el refuerzo como un proceso homeostático para limitar la propia señalización reforzante (Solomon y Corbit, 1974). Este proceso estaría además vinculado con la generación de tolerancia ante los efectos reforzantes de la sustancia, siendo estos progresivamente menos intensos a medida que se ha repetido la exposición (correspondiente al criterio 10 de la Tabla 1).

3. Preocupación/anticipación: En esta etapa predomina un deseo por la búsqueda de la sustancia que se ha propuesto como fundamental en el proceso de recaída, por lo que resulta de especial interés en la implementación del tratamiento de la adicción. Este estado ha sido denominado como craving (correspondiente al criterio 4 de la Tabla 1).

Estos procesos están estrechamente ligados a los circuitos corticales y del hipocampo (HPC) que, ante la aparición de claves contextuales vinculadas a la sustancia, regularían, mediante proyecciones descendentes glutamatérgicas (Kalivas, 2009; Geisler y Wise, 2008), la activación de estructuras que potenciarán la señalización de diferentes neurotransmisores de forma análoga a como sucedía en el estadio 1, con la diferencia de que la señal repercutirá a nivel del estriado dorsal en la activación de conductas previamente consolidadas: es decir, se produce un desplazamiento de áreas del estriado ventral, implicadas en el refuerzo, hacia áreas del estriado dorsal, implicadas en automatismos conductuales (Everitt et al., 2008). De no ser inhibidas por procesos corticales superiores, las conductas automáticas serán las responsables de la compulsión relacionada con el consumo, y se producirá una recaída en la toma de la sustancia.

Desde un marco teórico, en esta etapa culminaría el efecto combinado de la sensibilización del incentivo y los procesos oponentes, en la medida en que una mayor valoración subjetiva del incentivo (promovida por la aparición de claves contextuales asociadas) vendría facilitada por el estado en el que el sistema de estrés se encuentra activado y el sistema de recompensa se encuentra inhibido.

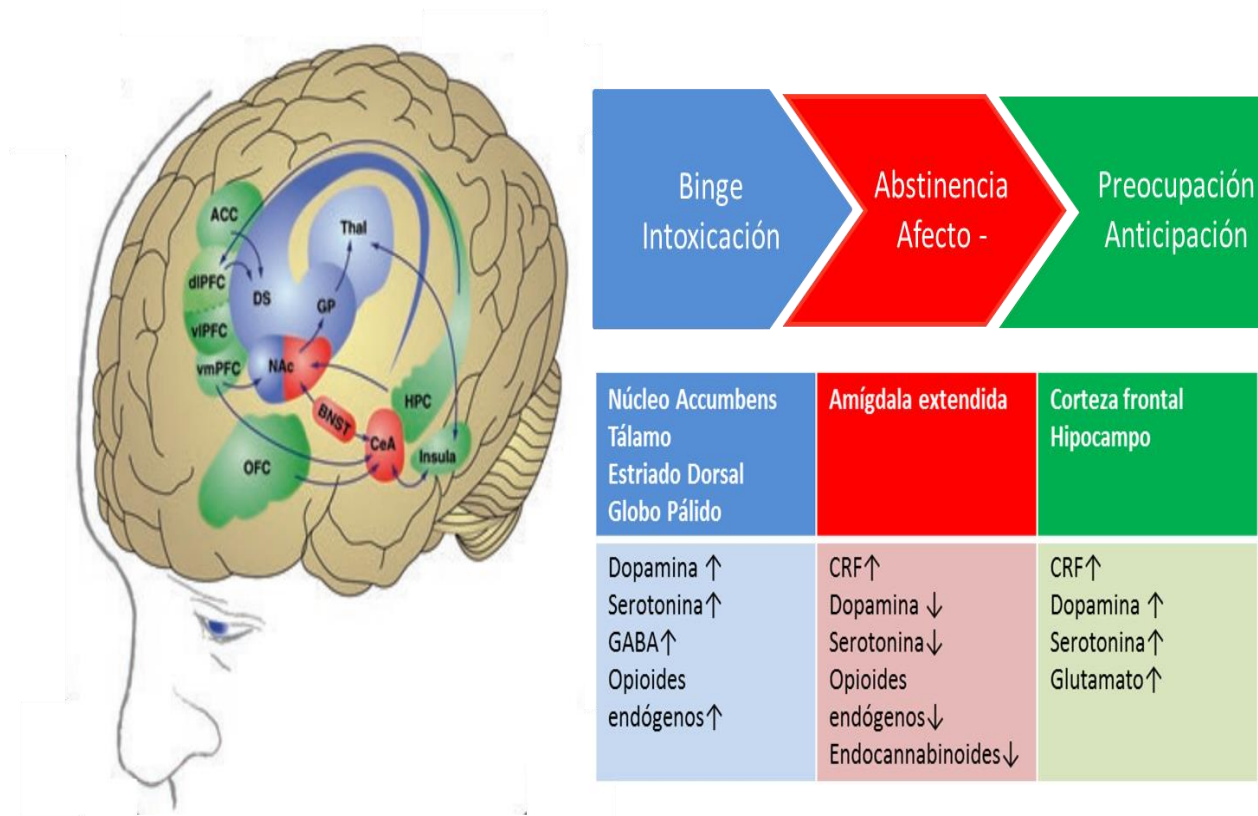


Figura 7. Representación esquemática de los 3 estadios que constituyen en el proceso adictivo, además de las principales estructuras cerebrales y sistemas de neurotransmisión implicados en cada uno de ellos. Modificado de Koob y Volkov, 2009; 2016. ACC: Corteza cingulada anterior; BNST: Núcleo basal de la estría terminal; CeA: Núcleo central de la amígdala; CRF: factor liberador de corticopropina; dIPFC: Corteza prefrontal dorsolateral; DS: Estríado dorsal; GP: Globo pálido; HPC: Hipocampo; NAc: Núcleo accumbens; OFC: Corteza frontal orbital; Thal: Tálamo; vIPFC: Corteza frontal ventrolateral; vmPFC: Corteza frontal ventromedial. (↑: aumento; ↓: disminución).

Estas etapas se suceden de forma cíclica desde un marco de auto-regulación homeostático, en el que los procesos mencionados oscilan dentro de un intervalo de equilibrio fisiológico estable. No obstante, a medida que se suceden los episodios de abstinencia y recaída en el consumo, el sistema actuará en términos de regulación alostática, es decir, que los mecanismos de regulación se sostendrán sobre un intervalo cambiante, que desplaza el eje sobre el que oscilaba inicialmente el equilibrio

afectivo, ampliando la magnitud de los procesos negativos en detrimento de los efectos reforzantes o positivos derivados del consumo la sustancia. Esto da como resultado la transición a un estado afectivo negativo en el que, además, tiene lugar un aumento en la valoración del incentivo, lo que aumenta la focalización por la búsqueda y el consumo de la sustancia como medio para anticiparse a los procesos oponentes que tienen lugar durante la abstinencia. Estos fenómenos conforman un estado de mayor vulnerabilidad a la recaída y cuando esta tiene lugar se inicia un nuevo ciclo que contribuirá a consolidar la adicción (Koob y Le Moal, 2001, representado en Figura 8).

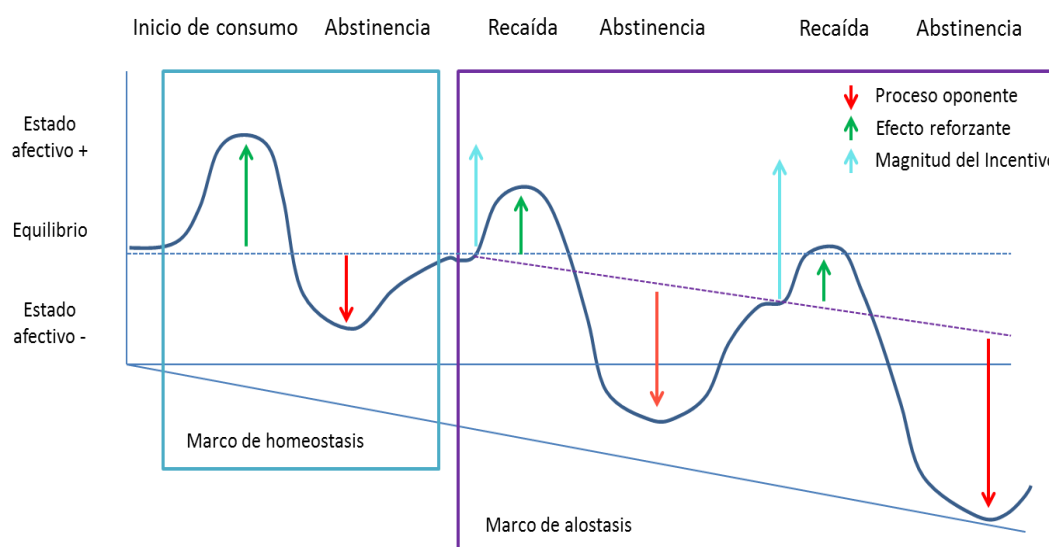


Figura 8. Representación gráfica del estado afectivo durante la transición que conforma el proceso adictivo. Basado en el modelo propuesto por Koob y Le Moal, 2001.

Como se ha descrito, el alcohol presenta multitud de dianas en el SNC. La complejidad de los mecanismos de adaptación del SNC resultantes de la interacción repetida con el alcohol altera los circuitos de neurotransmisión de diferentes estructuras cerebrales especialmente relacionadas con la valoración del refuerzo, la regulación del estrés, o la consolidación de patrones específicos de conducta (Cui et al., 2012; Kyzar y Pandey, 2015; Vengeliene et al., 2008). Estos factores confeccionan progresivamente una reconfiguración cerebral dirigida al consumo de esta sustancia de forma compulsiva. Como hemos visto, este proceso implica un cambio drástico desde un marco homeostático hasta uno alostático, dirigiendo al organismo a tratar de aliviar un estado afectivo negativo, poniendo en marcha, en detrimento de otras funciones reguladoras, una serie de conductas previamente consolidadas y dirigidas a

la búsqueda y al consumo de alcohol como el estímulo potencialmente paliativo de dicho malestar.

4.1.4 Tratamiento farmacológico del TUA

A pesar del severo impacto que los TUA presentan en la población a nivel mundial, algunos datos muestran que solo una pequeña parte de los pacientes estarían recibiendo un tratamiento (Kranzler y Soyka M, 2018). Actualmente se contemplan dos métodos de tratamiento no necesariamente excluyentes, la intervención psicosocial y la psicofarmacológica. La elección del tipo de intervención estará condicionada por características propias de estos pacientes, así como por la severidad del TUA.

De entre las intervenciones psicosociales, la terapia cognitivo conductual, la intervención motivacional o la terapia de 12 pasos serían quizás las que gozarían de una mayor consistencia en su eficacia (Ray et al., 2018). No obstante, atendiendo a la severidad del TUA o a la respuesta del mismo ante la intervención psicosocial, se puede indicar la prescripción coadyuvante de un tratamiento farmacológico (Goh y Morgan, 2017), aunque esta condición también podría estar siendo aplicada en menos casos de los que se estimaría necesario.

A este respecto, la elección de un tratamiento farmacológico efectivo y seguro está determinada por las características clínicas de los pacientes, lo que determinará el uso de un medicamento con un mecanismo de acción y un perfil de seguridad específico (Antonelli et al., 2018). Actualmente existen a nivel global tres medicamentos aprobados e indicados para el tratamiento farmacológico en el TUA, aunque existen indicaciones diferentes de otros fármacos dependiendo de cada país (Kranzler y Soyka M, 2018; Ray et al., 2018). Estos tratamientos, por medio de mecanismos específicos, tienen como objetivo reducir la motivación por retomar el consumo de alcohol, preservando así la abstinencia (ver tabla 2).

De entre los principales medicamentos actualmente disponibles, el disulfiram fue el primero en ser aprobado para el TUA. Este fármaco se administra por vía oral y actúa inhibiendo la actividad de la enzima ALDH, responsable de la degradación del acetaldehído que, como se ha mencionado anteriormente, será el producto obtenido

del metabolismo de alcohol responsable de los efectos aversivos o no deseados de su consumo (nauseas, vómitos, sudoración, palpitaciones, etc,..). El resultado de esta inhibición conlleva un aumento en los niveles sistémicos de acetaldehído, con el correspondiente aumento en los efectos aversivos mencionados (Hald et al., 1948). Este mecanismo actúa como un método disuasorio del consumo de alcohol, por lo que su eficacia viene determinada por la predisposición de los pacientes para evitar sufrir los efectos adversos del consumo. A pesar de que este fármaco ha sido usado desde mediados del siglo pasado, la constatación de su eficacia es aún inconsistente (Ray et al., 2018) y algunos autores han sugerido que su mecanismo de acción podría no estar abarcando aspectos fundamentales a tener en cuenta en el tratamiento del TUA, como la motivación por retomar el consumo (Heilig y Egli, 2006). Además, esto es algo que se correspondería, de hecho, con los criterios del trastorno que hacen referencia a que estos pacientes pueden mantener el consumo de alcohol aun entendiendo los efectos negativos que ello conlleva.

La naltrexona ha sido el segundo fármaco en ser aprobado a nivel global en el TUA. Su mecanismo de acción implica un bloqueo de los receptores delta (δ), kappa (κ) y mu (μ) de opioides endógenos (O'Brien et al., 1996). Teniendo en cuenta el papel de la señalización opioide endógena en el sistema de recompensa y el valor reforzante del alcohol (Laurent et al., 2014), antagonizar esta vía conlleva un bloqueo de la señal reforzante del alcohol que es mediada por la transmisión opioide, lo que disminuye el valor hedónico de la sustancia. Este mecanismo busca disminuir la motivación por consumir alcohol disminuyendo el valor incentivo asociado a la sustancia. Actualmente este fármaco se encuentra disponible en dos formatos, administrado por vía oral o por inyección intramuscular de liberación prolongada. A pesar de presentar algunas contraindicaciones específicas, este tratamiento goza de un respaldo empírico consistente (Ray et al., 2018).

Finalmente, el acamprosato cierra la breve lista de medicamentos indicados en el TUA a nivel global. Aunque el mecanismo de acción del acamprosato es aún objeto de estudio, se ha propuesto que este fármaco actuaría modulando la activación de los receptores NMDA (Zeise et al., 1993). En un estadio del ciclo adictivo en el que la transmisión glutamatérgica se encontraría hiperactivada (Alasmiri et al., 2018), la acción del acamprosato restablecería un equilibrio entre sistemas excitatorios e

inhibitorios de neurotransmisión (Dahchour et al., 1998). La acción de este fármaco, sobre los receptores NMDA paliaría las alteraciones observadas en la abstinencia como consecuencia del estado de desregulación en la señalización glutamatérgica, y por tanto, podría atenuar también el impacto que este estado tendría sobre la vulnerabilidad para recuperar el consumo (Kalivas y Volkow, 2011). De forma similar a la naltrexona, la eficacia del acamprosato ha sido contrastada a través de múltiples estudios (Ray et al., 2018).

Principio activo	Mecanismo de acción	Efecto neurobiológico	Efecto psicofisiológico	Indicación y evidencia clínica
Disulfiram	Inhibidor de ALDH	↑acetaldehído	↑efectos no deseados del alcohol	TUA moderado Inconsistente
Naltrexona	Antagonista de receptores opioides	Bloqueo de señalización opioide	↓efecto reforzante del alcohol	TUA moderado Consistente
Acamprosato	Antagonista de NMDA	↓hiperexcitabilidad neural propia de la abstinencia	↓malestar psicofisiológico de la abstinencia	TUA moderado y severo Consistente

Tabla 2. Características de los principales fármacos indicados en el TUA. Basado en Ray et al., 2018. (↑: aumento; ↓: disminución).

Aunque estos tres fármacos son los que presentan una mayor disponibilidad a nivel global, existen otros no aprobados para el TUA que sin embargo están disponibles y son utilizados en estos pacientes. De entre estos, la vareniclina, un antagonista de los receptores nACh $\alpha 4\beta 2$ (Mihalak et al., 2006) indicada para la dependencia de nicotina, es posiblemente uno de los que presenta resultados más prometedores. Por otro lado, el nalmeveno, un modulador de los receptores opioides que presenta algunas diferencias en su mecanismo de acción con respecto a la naltrexona (Biggio, 2015), ha mostrado una menor evidencia empírica que los fármacos antes mencionados. El uso de anticonvulsivantes en el TUA también ha sido objeto de estudio, así se han empleado fármacos como el topiramato, un antagonista de los receptores AMPA (Angehagen et al., 2005) y modulador de la actividad del receptor GABA (White et al., 2000), o la gabapentina, un modulador de la actividad de

los receptores GABA (Sills, 2006), aunque hasta la fecha, la evidencia sobre su eficacia es aún inconcluyente.

4.2 El trastorno depresivo

4.2.1 Epidemiología y criterios diagnósticos

El concepto de depresión aparece ya reflejado en los primeros escritos de Hipócrates que datan del siglo IV a.C bajo el término “melancolía” y se nos presenta como una alteración del estado mental, corporal y espiritual que se manifiesta en forma de episodios de miedo o tristeza prolongados en el tiempo. A este estado se le añaden posteriormente otros síntomas como aversión a la comida, irritabilidad, insomnio e inquietud, que mantienen una considerable semejanza con lo que actualmente entendemos como los síntomas que conforman este trastorno (ver en Horwitz et al., 2016).

Los trastornos depresivos, entre los que se encuentra la depresión mayor, se clasifican dentro de la amplia categoría diagnóstica de los trastornos mentales. Las estimaciones más recientes señalan que la depresión podría afectar a más de 320 millones de personas en todo el mundo, el equivalente a un 4,4% de la población mundial, unas cifras que podrían haber aumentado en los años posteriores a 2015, cuando se realizaron las estimaciones. La depresión es un trastorno que puede desembocar en el suicidio y supone la causa de discapacidad con el mayor impacto sobre la salud mundial (WHO, 2017).

Bajo los criterios recogidos por la 5ª edición del el diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (APA, 2014), la depresión mayor está comprendida dentro del cumplimiento de 5 de entre 9 posibles síntomas que se manifiestan simultáneamente al menos durante dos semanas, siempre que se cumpla uno de los 2 primeros criterios (ver tabla 3). Estos síntomas causan un malestar significativo o deterioro social, laboral o en otros ámbitos. Además, los síntomas no se explican mejor por la presencia de trastornos del espectro de la esquizofrenia ni de los trastornos psicóticos, y tampoco son atribuidos a los efectos fisiológicos inducidos por una sustancia u afección médica. Finalmente, el diagnóstico de depresión debe descartar la existencia de episodios maníacos e hipomaníacos.

1. Estado de ánimo deprimido la mayor parte del día, casi todos los días, según se desprende de la información subjetiva o de la observación por parte de otras personas.
2. Disminución importante del interés o el placer por todas o casi todas las actividades la mayor parte del día, casi todos los días (como se desprende de la información subjetiva o de la observación por parte de otras personas).
3. Pérdida importante de peso sin hacer dieta o aumento de peso, o disminución del apetito casi todos los días.
4. Insomnio o hipersomnia casi todos los días.
5. Agitación o retraso psicomotor casi todos los días.
6. Fatiga o pérdida de energía casi todos los días.
7. Sentimiento de inutilidad o culpabilidad excesiva o inapropiada (que puede ser delirante) casi todos los días (no simplemente el autorreproche o culpa por estar enfermo).
8. Disminución de la capacidad para pensar o concentrarse, o para tomar decisiones, casi todos los días (a partir de la información subjetiva o de la observación por parte de otras personas)
9. Pensamientos de muerte recurrentes (no solo miedo a morir), ideas de suicidio recurrentes sin un plan determinado, intento de suicidio o un plan específico para llevarlo a cabo.

Tabla 3. Criterios diagnósticos de la depresión mayor. De APA, 2014.

4.2.2 Neurobiología de la depresión

4.2.2.1 La hipótesis monoaminérgica de la depresión

El surgimiento de la hipótesis monoaminérgica de la depresión se remonta a la década de los 50 del pasado siglo y está entrelazado con el desarrollo de los fármacos antidepresivos que se utilizan en la actualidad (Schildkraut, 1965). Esta hipótesis surge como la convergencia de diferentes líneas de investigación inicialmente independientes que se mencionarán a continuación.

Las monoaminas son neurotransmisores sintetizados a partir de diferentes aminoácidos en regiones concretas del encéfalo, ejercen su acción sobre receptores específicos para, posteriormente, ser recaptadas y biodegradadas. Dentro de este

grupo se encuentran, por un lado las catecolaminas, como la dopamina y la noradrenalina, cuyo precursor es la tirosina, y por otro lado, entre otras, las triptaminas, como la 5-HT, sintetizada a partir de triptófano. La señalización de estas monoaminas está relacionada con múltiples funciones como la regulación del sueño, del estado de ánimo o la regulación del sistema de recompensa cerebral. Estas tres monoaminas son quizás las que más protagonismo han tenido en la consolidación de la hipótesis monoaminérgica de la depresión (Hamon y Blier, 2013).

A mediados del siglo XX, diferentes estudios reportaron la aparición de casos de depresión entre pacientes que se encontraban bajo tratamiento con reserpina para la hipertensión (Muller et al., 1955). El mecanismo capaz de inhabilitar los reservorios de catecolaminas de la reserpina llevó a los autores a vincular la reducción en la disponibilidad de estos neurotransmisores con la depresión inducida por el tratamiento. Este supuesto vino respaldado por estudios postmortem en los que los pacientes que habían padecido depresión mostraron una reducción en la concentración cerebral de 5-HT (Shaw et al., 1967). Esto promovería el desarrollo de fármacos antidepresivos dirigidos a restablecer la señalización monoaminérgica (especialmente la señal 5-HT) cuya desactivación se propuso como factor causal de la depresión. Inicialmente, estos estudios con antidepresivos parecían confirmar esta hipótesis (ver a continuación). No obstante, con los años, los mismos autores manifestaron la excesiva simplicidad de esta teoría, estableciéndola como un punto de referencia para ampliar el conocimiento sobre un trastorno tan complejo como la depresión (Schildkraut, 1995).

4.2.2.2 La teoría de la neuroplasticidad de la depresión

La neuroplasticidad constituye el principal factor de adaptación morfológica y funcional del SNC ante estímulos intero y exteroceptivos que resulta clave en la fisiopatología y la recuperación de diferentes trastornos psiquiátricos (Cramer et al., 2011). Dentro de los distintos niveles de adaptación morfológica se incluirían procesos de neurogénesis, formación y potenciación de sinapsis, cambios en la densidad y arborización dendrítica, así como alteraciones en la expresión de determinados genes, que finalmente repercutirían en la propia supervivencia neuronal (Castrén y Hen, 2013).

Ver figura 9). Estos procesos confluyen en una reconfiguración y adaptación funcional del SNC, pero al mismo tiempo, las alteraciones en los mismos conducirían a procesos de neurodegeneración y daño cerebral que constituyen la base neurobiológica de múltiples patologías.

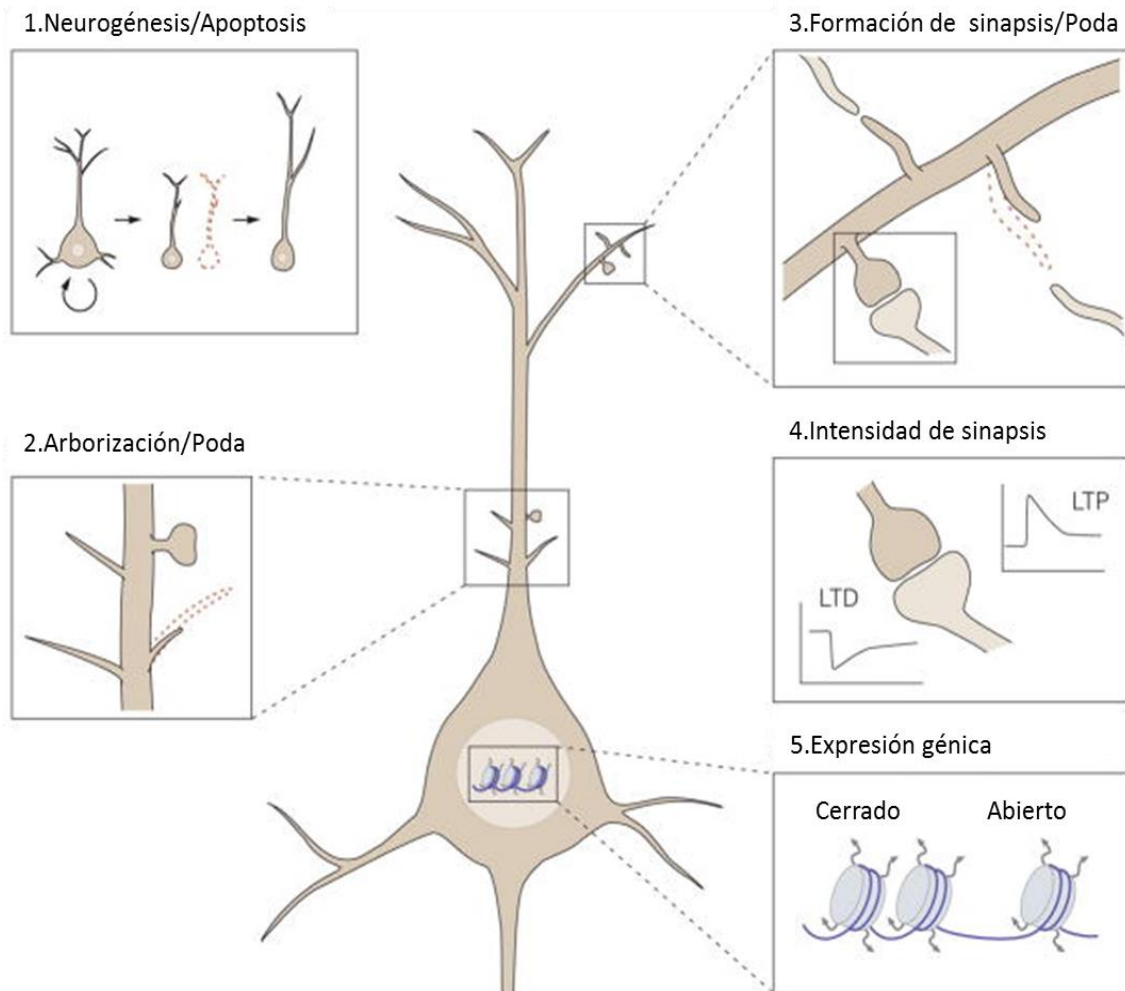


Figura 9. Representación esquemática de los procesos de neuroplasticidad. Modificado de Castrén y Hen, 2013.

Los primeros hallazgos parecían indicar que la desactivación monoaminérgica precipitaría la depresión y que los fármacos antidepresivos ejercían su efecto terapéutico a través de diferentes mecanismos que convergerían en restaurar la dicha señalización. Ciertos indicios de estudios posteriores revelarían que la etiología de la depresión y los procesos que subyacían al efecto terapéutico de los antidepresivos mostrarían una mayor complejidad, indicando que la inhibición/activación monoaminérgica actuaría como un importante mecanismo modulador de otros muchos aspectos neurobiológicos involucrados en la fisiopatología y en la recuperación de la depresión (Charney, 1998; Heninger et al., 1996).

Al mismo tiempo, otros estudios revelaban que los pacientes depresivos presentarían indicios de atrofia y muerte celular en estructuras como la CPF y el HPC, y por otro lado, que los modelos animales de depresión, sometidos a diversos protocolos de exposición a estrés, mostrarían alteraciones similares en los distintos procesos de neuroplasticidad mencionados (ver en Duman et al., 1999; Liu et al., 2017). Paralelamente, los resultados obtenidos en los estudios con antidepresivos también contribuyeron a replantear la hipótesis inicial. Así, el tratamiento farmacológico mostraba un porcentaje significativo de pacientes que no respondían adecuadamente al mismo (Al-Harbi, 2012; McIntyre et al., 2014), y, quizás algo más interesante, su efecto terapéutico era observable solo tras un tratamiento prolongado (Rush et al., 2006). Esto llevó a algunos autores a sugerir que la demora del efecto terapéutico del antidepresivo podía corresponderse con el tiempo necesario para revertir el impacto de la depresión sobre los distintos niveles de la neuroplasticidad cerebral (Castrén y Hen, 2013; Levy et al., 2018).

Este fenómeno, tal como se postuló inicialmente (Duman et al., 1999), requeriría de la activación de procesos de señalización intracelular dependientes de adenosin monofosfato cíclico (AMPC), que a su vez inducirían un aumento en la expresión y en los niveles de neurotrofinas y factores de crecimiento, de entre los cuales, el factor neurotrófico derivado del cerebro sería el que adquiriera un mayor interés por la investigación debido a sus efectos sobre los diferentes eventos de neuroplasticidad en el contexto de la depresión (Levy et al., 2018).

Actualmente se contempla un marco teórico integrado, en el que las monoaminas, especialmente la 5-HT, tienen un protagonismo importante en la depresión, en la medida en que los antidepresivos monoaminérgicos sostienen o promueven diferentes aspectos de la neuroplasticidad cerebral involucrados en la fisiopatología y la recuperación de este trastorno (Castrén y Hen, 2013; Liu et al., 2017).

4.2.3 Tratamiento farmacológico de la depresión

A principios de los años 50, un estudio clínico reportó una serie de "efectos secundarios" en pacientes con tuberculosis tratados con iproniazida, síntomas entre los que se encontraron euforia, psicoestimulación, aumento del apetito y mejora del sueño (Fox y Gibas, 1953). Posteriormente, un estudio clínico sistemático en pacientes con depresión, en el que se empleó un tratamiento con iproniazida durante varias semanas, mostró una mejora sintomática en la mayoría de los pacientes (Loomer et al., 1957). El mecanismo de acción de la iproniazida consiste en la inhibición de la actividad de la monoamino oxidasa (MAO), una familia de enzimas encargadas de la degradación de las aminas biógenas y simpatomiméticas. La iproniazida ejerce una inhibición inespecífica sobre las dos grandes familias de isoenzimas (MAO_A y MAO_B), dando lugar a una serie de efectos adversos que hicieron que su eficacia y tolerabilidad se vieran comprometidas y fuera retirada del mercado. Aunque finalmente no cumpliera con los requisitos de eficacia y seguridad, este fármaco abrió el camino para el desarrollo de la primera generación de antidepresivos, caracterizados por un mecanismo de acción selectivo, los inhibidores de la MAO tipo A. Concretamente, la inhibición de la MAO_A ha sido el mecanismo de acción al que se atribuyen los efectos antidepresivos de esta generación de fármacos, siendo responsable de bloquear la degradación presináptica específicamente de las principales aminas biógenas, como la 5-HT, la dopamina y la noradrenalina, aumentando así su disponibilidad a nivel postsináptico (Shulman et al., 2013). Aunque esta generación de medicamentos se vería relegada a un segundo plano ante el desarrollo de otros fármacos antidepresivos, actualmente se contempla el uso de inhibidores de la MAO_A (IMAO_A) en ciertos pacientes que, atendiendo con precaución a las interacciones con medicamentos y alimentos que comprometerían la señalización 5-HT, podrían beneficiarse en mayor medida de este tratamiento que de otros cuya prescripción sería más frecuente (Shulman et al., 2013).

Inmediatamente después de estos estudios, la segunda familia de fármacos antidepresivos surge ante los efectos observados en pacientes con esquizofrenia tratados con un compuesto con una modificación en la estructura molecular de la clorpromacina, la imipramina. Si bien el tratamiento no mostró los efectos

antipsicóticos esperados, si se observó una mejoría en los pacientes que padecían depresión (Kuhn, 1958). Además, a diferencia de lo acontecido con los IMAOs, no se reportaron efectos adversos del tratamiento. De esta forma, la imipramina fue aprobada para la depresión, siendo el primer fármaco de la generación de los antidepresivos tricíclicos (ATCs), así denominados por su núcleo molecular compuesto de tres anillos de benceno (ver Figura 10). Esta familia de antidepresivos presenta mecanismos de acción dirigidos a algunos transportadores y receptores de diferentes sistemas de neurotransmisión. Aunque inicialmente se desconocía el mecanismo específico a través del cual estos tratamientos ejercerían su efecto terapéutico, estudios posteriores indicarían que su capacidad para inhibir los transportadores de 5-HT y noradrenalina, evitando su recaptación y prolongando la señalización postsináptica, podría ser el mecanismo fundamental de su eficacia (Owens et al., 1997; Sánchez y Hyttel, 1999). Fue precisamente el interés por estos mecanismos lo que abriría el camino al desarrollo de la tercera gran familia de antidepresivos.

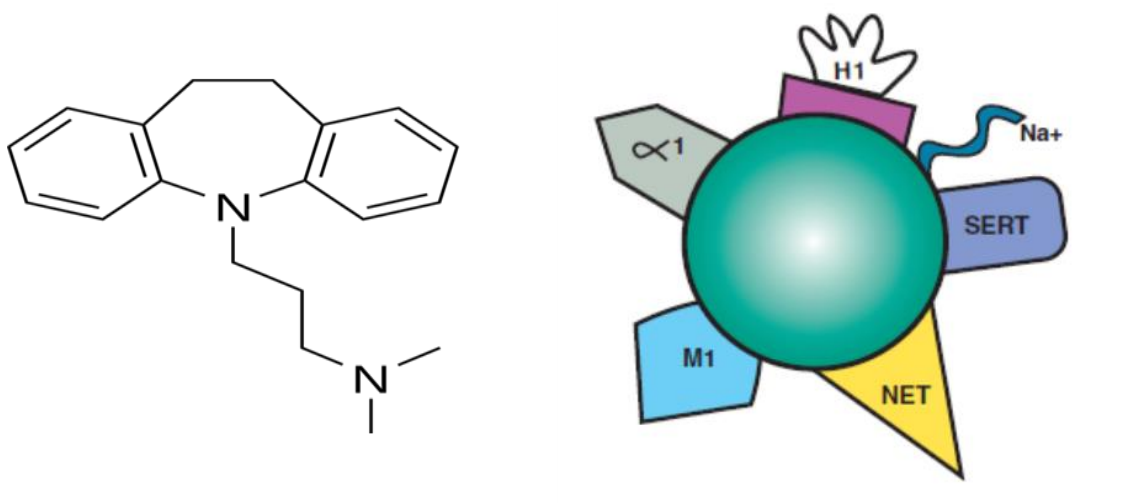


Figura 10. Estructura molecular y representación esquemática del mecanismo de acción de los antidepresivos tricíclicos (ATCs). De Sthal, 2013. M1: receptor muscarínico 1; H1: Receptor de histamina 1; NET: transportador de noradrenalina; SERT: transportador de 5-HT; α_1 : Receptor adrenérgico 1; Na⁺: canal de sodio activable por voltaje.

A finales de los 60, surgió el debate sobre cuáles eran las monoaminas y los mecanismos de acción que tendrían una mayor repercusión en la fisiopatología y el tratamiento de la depresión. En este contexto, fue ganando relevancia la propuesta de que los antidepresivos ejercerían su efecto terapéutico sobre el estado de ánimo fundamentalmente a través de la inducción de un aumento en la señalización 5-HT y que la inducción de la señal noradrenérgica podría estar vinculada a otros aspectos

sintomáticos de la depresión (Lapin y Oxenkrug, 1969). Esto incentivó el interés de las farmacéuticas por desarrollar moléculas cuyo mecanismo de acción estuviera dirigido a inhibir los transportadores encargados de la recaptación de 5-HT. De esta manera, sería en 1974 cuando la farmacéutica Eli Lilly propondría la fluoxetina, el primer inhibidor selectivo de la recaptación de 5-HT (ISRS), como un posible fármaco antidepresivo (Wong et al., 1974; 1975; figura 11). Pocos años después, la fluoxetina sería aprobada y lanzada al mercado bajo el nombre comercial Prozac®, abriendo el camino a toda una generación de ISRSs, como la sertralina, el citalopram, y la paroxetina. A diferencia de las dos familias antes mencionadas, estos fármacos mostraron ejercer un efecto más selectivo sobre la recaptación de 5-HT, con efectos débiles sobre la liberación de neurotransmisores o en la activación de receptores específicos, a los que se atribuían algunos de los efectos no deseados de los ATCs y los IMAOs.

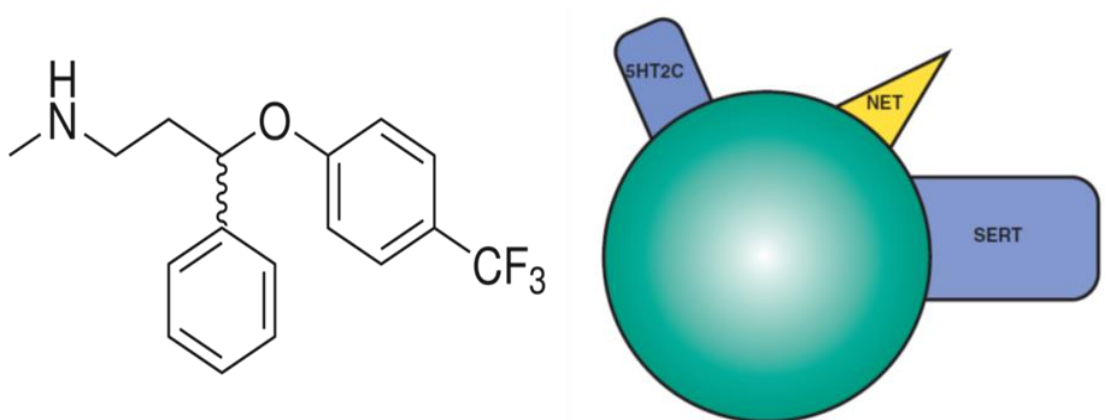


Figura 11. Estructura molecular y representación esquemática del mecanismo de acción de la fluoxetina. De Sthal, 2013. NET: transportador de noradrenalina; SERT: transportador de 5-HT.

El carácter selectivo del tratamiento parecía ser fundamental en la eficacia y seguridad de estos fármacos, y surgió el interés por mecanismos de acción similares pero enfocados en otros sistemas de neurotransmisión. A partir de esta línea aparecerían los denominados antidepresivos atípicos. El primero de estos en ser aprobado para la depresión fue el bupropion, en una fórmula inicial de liberación inmediata, a la que se añadiría posteriormente una formulación de liberación prolongada. Este fármaco difiere en gran medida del resto de antidepresivos, con un mecanismo de acción que no presenta ningún otro medicamento y aprobado para la depresión buscando evitar algunos efectos no deseados de otros tratamientos (Soroko

y Maxwell, 1983; figura 12). El bupropion presenta una afinidad por los transportadores de noradrenalina y, especialmente elevada, por los transportadores de dopamina, siendo débil ante los transportadores de 5-HT u otros receptores postsinápticos (IRDN) (Stahl et al., 2004). Además, este particular mecanismo de acción ha demostrado ser eficaz a la hora de reducir el consumo de tabaco en los pacientes, razón por la que el bupropion se establecería además como un tratamiento indicado para el tabaquismo (Richmond y Zwar, 2003).

Posteriormente surgirían otros antidepresivos atípicos como la venlafaxina y la duloxetina, inhibidores de la recaptación de noradrenalina y 5-HT (IRSNs). Aunque este mecanismo es similar al de los ATCs, estos nuevos antidepresivos no mostraron acción farmacológica sobre receptores específicos (Bymaster et al., 2001) pero sí una eficacia similar a los ISRSs (Papakostas et al., 2007).

También surgieron antidepresivos inhibidores selectivos de la recaptación de noradrenalina, como la reboxetina (ISRNs) (Andreoli et al., 2002). Por último, más recientemente, sería aprobada la vortioxetina, con un mecanismo que combinaba la inhibición de la recaptación de 5-HT y una afinidad por algunos de sus receptores, con una afinidad moderada por los transportadores de noradrenalina y dopamina (Bang-Andersen et al., 2011).

En la actualidad, se contemplan al menos 6 principales subfamilias de antidepresivos monoaminérgicos (tabla 4) que forman parte del tratamiento secuenciado y/o combinado en pacientes con depresión y cuya prescripción ha ido en aumento en los últimos años, siendo especialmente utilizados los ISRSs y los ATCs (Abbing-Karahagopian et al., 2014). Además, se utilizan frecuentemente en combinación con otros tratamientos en otras patologías, especialmente en los trastornos por abuso de sustancias, como el TUA (Barajaz y Kliethermes, 2017; Hillemacher y Frieling, 2019; Pettinati et al., 2013; DeVido y Weiss, 2012; Lee y Leggio, 2014).

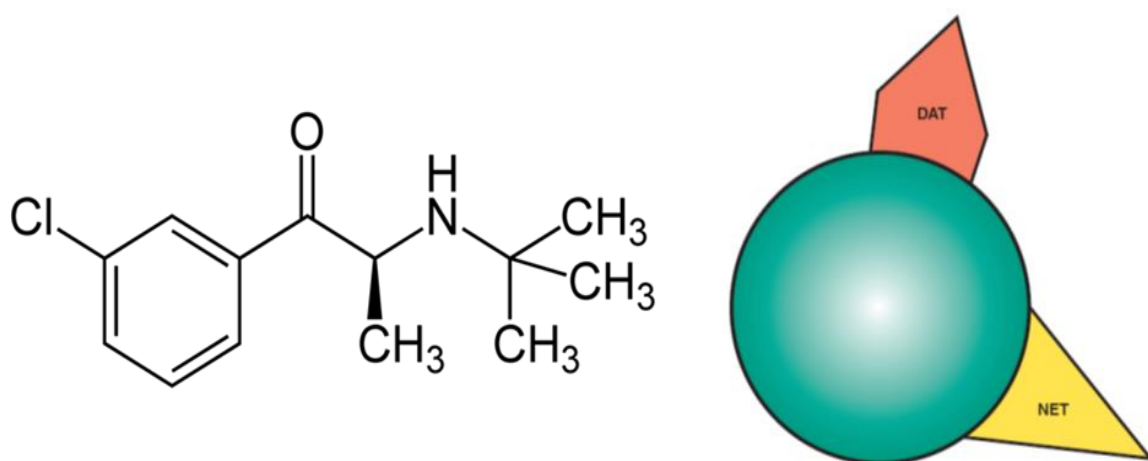


Figura 12. Estructura molecular y representación esquemática del mecanismo de acción del bupropion. De Sthal, 2013. NET: transportador de noradrenalina; DAT: transportador de dopamina.

familia	Mecanismo de acción	Principio activo	Efecto neurobiológico	Indicación
IMAO	Inhibe enzima MAO	Moclobemida Tranilcipromina	↑ disponibilidad de aminas	Ante no respuesta a otros
ATC	Bloquea: -transportadores 5-HT y noradrenérgicos -receptores M1, H1, y α_1	Imipramina Clomipramina Desipramina		2ª indicación Alteración del sueño
ISRS	Bloquea transportadores 5-HT	Fluoxetina Sertralina Citalopram	↑ disponibilidad 5-HT	1ª indicación
IRSN	Bloquea transportadores 5-HT y noradrenérgicos	Venlafaxina Duloxetina	↑ disponibilidad 5-HT y noradrenalina	Fatiga
ISRN	Bloquea transportadores noradrenérgicos	Reboxetina	↑ disponibilidad noradrenalina	Falta de concentración
IRDN	Bloquea transportadores dopaminérgicos y noradrenérgicos	Bupropion	↑ disponibilidad dopamina y noradrenalina	↓ interés ansiedad

Tabla 4. Características de las principales familias de antidepresivos monoaminérgicos. Basado en Sthal, 2013.

4.3 La comorbilidad TUA-depresión

Los procesos emocionales, motivacionales y afectivos anteriormente mencionados han cobrado especial relevancia en el enfoque utilizado para estudiar el trastorno por uso de sustancias, en especial su variante más grave, la adicción (Koob, 2015). Este aspecto de la adicción se conoce como *“the dark side”* o lado oscuro de la adicción, y ha sido propuesto como un importante componente mediador en la compleja relación existente entre el TUA y la depresión (Ehlers et al., 2019; Peng et al., 2019).

La integración de numerosos estudios epidemiológicos muestra una fuerte relación entre el TUA y otras patologías psiquiátricas. Concretamente, la depresión sería, junto con los trastornos por estrés postraumático, la patología que mostraría una mayor tasa de comorbilidad con el TUA (Hasin y Grant, 2015). Así se ha observado, por un lado, que los pacientes con depresión padecen un TUA con mayor frecuencia que la población general (Boschloo et al., 2011; 2013), con estimaciones que indican que, de entre los pacientes depresivos, un 16% cursarían y un 30% habrían padecido alguna vez un TUA (Sullivan et al., 2005) y, por otro lado, posiblemente en mayor medida, los pacientes con TUA tienen una mayor probabilidad de presentar depresión que la población general (Fergusson et al., 2009; Hasin et al., 2007). Además, aunque la depresión relacionada con el TUA aparece con frecuencia en un espacio relativamente cercano en el tiempo, diversos estudios han mostrado que las repercusiones del TUA sobre los síntomas depresivos puede mantenerse incluso años después de que el episodio alcohólico haya tenido lugar (Boschloo et al., 2012a; Brennan et al., 2016; Skogen et al., 2016).

Se han propuesto diversas teorías que explicarían la relación entre el TUA y la depresión. Concretamente, se ha partido de la posibilidad de la existencia de factores comunes que conferirían una mayor vulnerabilidad ante ambas patologías, y por otro lado, ha ganado fuerza la hipótesis de una posible relación causal entre ellas, lo que además podría contemplar que algunos factores comunes derivados de una primera patología repercutirían indirectamente en el desarrollo de la segunda (Boden y Fergusson, 2011). Así, aspectos de la personalidad como la emotividad negativa y la impulsividad, o aspectos clínicos y sociodemográficos, como el estar bajo medicación

(especialmente con antidepresivos) o situaciones de divorcio y desempleo, se han propuesto como factores de comorbilidad especialmente significativos (Boschloo et al., 2012b; Marquez-Arrico et al., 2019). Además, la hipótesis de la relación causal apuntaría a la existencia de factores genéticos (Foo et al., 2018; Peng et al., 2019) y epigenéticos (Pandey et al., 2017) que repercutirían a nivel neurobiológico en múltiples sistemas de neurotransmisión y que, al presentarse en una de las patologías, actuarían como un mecanismo de vulnerabilidad para padecer el trastorno comórbido (Markou et al., 1998).

Si bien la coexistencia de estos trastornos supone en cualquier caso una dificultad añadida desde el punto de vista de la intervención (DeVido y Weiss, 2012), diferentes estudios han puesto de manifiesto que el tipo de relación causal entre la depresión y el TUA tendría distintas repercusiones en el curso de estos pacientes. Por esta razón se propuso una categorización de la comorbilidad entre ambas patologías atendiendo a aspectos cronológicos en la aparición de las mismas. De esta forma se estableció una depresión primaria, anterior a la aparición del TUA, y una secundaria, precedida por el TUA (Schuckit, 1985). Posteriormente, se estableció un criterio más amplio de clasificación que describe la depresión secundaria como una depresión inducida por el alcohol, definida como un síndrome muy similar al trastorno depresivo, con la particularidad de que surgiría en estadios de intoxicación severos o en fases tempranas de la abstinencia y mostraría una remisión en estadios avanzados de la abstinencia. Por otro lado, esta clasificación amplía el concepto de depresión independiente, no solo a la depresión previamente clasificada como primaria, sino también la depresión que tiene lugar en estadios avanzados de la abstinencia (Schuckit et al., 1997, representado en Figura 13). Esta distinción supone, no obstante, una dificultad añadida a la hora de discriminar una depresión inducida por el TUA de una independiente que tiene lugar en la abstinencia, debido a la similitud sintomática y al solapamiento temporal de ambas clasificaciones, además, la depresión inducida ha mostrado ser un trastorno inestable, con un potencial significativo de desembocar en un diagnóstico independiente del TUA (Brown et al., 2011).

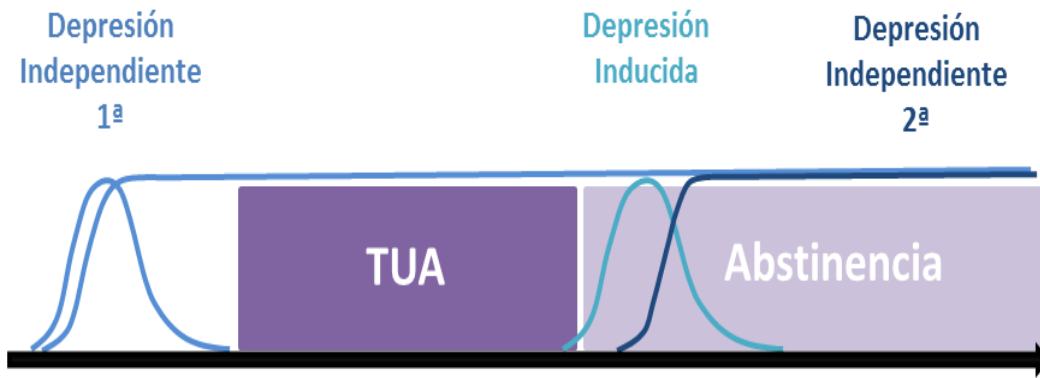


Figura 13. Esquema longitudinal de la clasificación de la depresión con respecto al TUA. Basado en Schuckit et al., 1997.

Desde un enfoque teórico, existen diferentes hipótesis de causalidad entre ambos trastornos (Markou et al., 1998). Quizás la más afianzada de estas propuestas sería la hipótesis de la auto-medicación, según la cual se postula que el deseo por consumir alcohol viene determinado por la necesidad de paliar un estado afectivo negativo, tratando de utilizar las propiedades farmacológicas del alcohol con un fin “terapéutico”. Aunque esta hipótesis en principio explicaría la aparición del TUA a consecuencia de una depresión previa, es importante señalar que sería compatible con la teoría de los procesos oponentes en un marco en el que la sintomatología que se trata de auto-medicar deriva de fases de la abstinencia del propio TUA, lo que ampliaría el concepto de la hipótesis, abarcando una relación no solo de causalidad, sino también de mantenimiento del TUA (Boden y Fergusson, 2011; Bolton et al., 2009; Markou et al., 1998).

Recientemente se ha propuesto que las condiciones afectivas desencadenadas por el TUA y ligadas a la sintomatología depresiva estarían estrechamente vinculadas con la motivación por el consumo de alcohol. Además, este factor podría constituir no tanto un estadio propio de la adicción como una variante o subtipo característico de algunos pacientes con TUA. Concretamente, más de la mitad de los pacientes con TUA severo mostrarían una motivación por consumir alcohol ligada a los síntomas representativos del estado afectivo negativo fruto del trastorno adictivo (Ehlers et al., 2019). Teniendo en cuenta la fuerte relación entre el estado afectivo negativo presente durante la abstinencia alcohólica, los síntomas depresivos y el curso del TUA, se ha acentuado la necesidad de abordar esta sintomatología, especialmente en los casos en que esta tendría un impacto especialmente significativo a la hora de facilitar

la recaída en el consumo de alcohol y empeorar el curso del TUA. Como se describe en adelante, el tratamiento farmacológico antidepresivo en estos pacientes supondría un factor clave en la recuperación, si bien la evidencia sobre su eficacia se encontraría aún en un estado inconcluyente.

4.3.1 Neurobiología de la comorbilidad TUA-depresión

Desde una perspectiva neurobiológica, se han identificado diferentes sistemas de neurotransmisión y procesos de neuroplasticidad cerebral que estarían implicados en la fisiopatología de ambos trastornos, siendo quizás las alteraciones en la señal de 5-HT) las más estudiadas en investigación (Belmer et al., 2016; Markou et al., 1998; Renoir et al., 2012).

Como se indica en el apartado 4.2.2, la transmisión de 5-HT ha sido propuesta como un elemento fundamental en los trastornos del estado de ánimo como la depresión. Por otro lado, años atrás se observó que la señal 5-HT actuaría como un posible mecanismo mediador de la motivación por consumir alcohol por su participación en la señalización reforzante durante el consumo (Lovinger, 1997). En adelante, numerosos estudios han llevado a algunos autores a señalar que las alteraciones en la misma tendrían un papel importante no solo en la señal reforzante del alcohol, sino también en los diferentes estadios de la progresión del TUA, que finalmente contribuirían a una mayor vulnerabilidad en la recaída (Belmer et al., 2016; Marcinkiewicz, 2015; Renoir et al., 2012), si bien la participación del sistema 5-HT en este trastorno tendría complejas interacciones que permanecen aún por esclarecer. Aunque la función 5-HT parece ser un fuerte nexo neurobiológico entre el TUA y la depresión, también se han identificado otros sistemas que podrían estar vinculados a aspectos sintomáticos concretos, como el papel de la señal dopaminérgica en la anhedonia, un síntoma compartido por ambas patologías (Hatzigiakoumis et al., 2011; Markou et al., 1998). Además, la comorbilidad entre el TUA y la depresión podrían estar mediados en parte por una alteración en la señal noradrenérgica (Markou et al., 1998; Getachew et al., 2010; 2017). Así, estos estudios apuntarían a que una parte importante de la relación entre la depresión y el TUA estaría mediada por una reducción en la transmisión de los sistemas 5-HT, dopaminérgico y noradrenérgico.

No obstante, cabe señalar la existencia de otros sistemas que han mostrado una relevancia creciente en la comorbilidad entre el TUA y la depresión (Markou et al., 1998). De entre ellos, este manuscrito se centra en los sistemas glutamatérgico y endocannabinoide (EC), cuya participación en ambos trastornos se describe en adelante de forma más exhaustiva.

El sistema glutamatérgico constituye quizás el principal factor de señalización excitatoria que subyace a los procesos de neuroplasticidad del SNC (Abraham, 2008). Por otro lado, se observó que el sEC constituiría un importante modulador de la transmisión glutamatérgica, participando indirectamente sobre procesos de neuroplasticidad (Auclair et al., 2000). De este modo, el papel de ambos sistemas ha obtenido un gran interés para la investigación como mecanismos potencialmente mediadores en los procesos de neuroplasticidad involucrados en la fisiopatología tanto de la depresión como de el TUA, así como del efecto del tratamiento antidepresivo (Araque et al., 2017, Hillhouse y Porter, 2015; Kalivas y Volkow, 2011; Renoir et al., 2012; Sanacora et al., 2012; Scarante et al., 2017; Viveros et al., 2007; Yamamoto y Reagan 2006). De hecho, como se describe en adelante, las alteraciones en los sistemas EC y glutamatérgico encontradas en ambas patologías resultan ser semejantes, lo que a su vez podría constituir un importante nexo neurobiológico de la comorbilidad psiquiátrica.

Finalmente, dentro de los diferentes niveles de la neuroplasticidad cerebral, la generación e incorporación de nuevas neuronas en el HPC adulto ha suscitado un gran interés por su posible implicación tanto en la etiología como en la recuperación de la depresión (Peng y Bonaguidi, 2018) y el TUA (Olsufka et al., 2018), así como en la comorbilidad de ambos trastornos (Renoir et al., 2012; Chambers, 2013).

4.3.1.1 El sistema glutamatérgico

El glutamato es el aminoácido no esencial más abundante del SNC, cuya función de neurotransmisión excitatoria fue caracterizada a través de diferentes estudios llevados a cabo entre los años 50 y 80 (Biscoe et al., 1977; Hayashi, 1954; Curtis et al., 1960). Paradójicamente, el glutamato ha sido identificado además como el precursor del GABA (Roberts y Frankel, 1950), el principal neurotransmisor inhibitorio del SNC. El glutamato es liberado a nivel postsináptico como consecuencia de un potencial de acción neural y su señalización excitatoria postsináptica esta mediada por distintos receptores ampliamente localizados en diferentes regiones encefálicas.

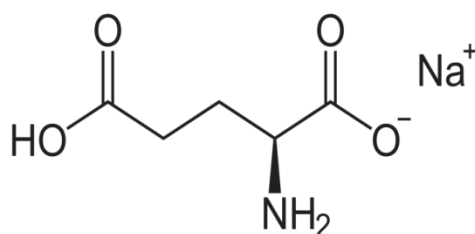


Figura 14. Estructura molecular del ácido glutámico.

Estos receptores están divididos en dos familias, los receptores ionotrópicos y los metabotrópicos. Entre los ionotrópicos, se encuentra en el receptor NMDA (ver apartado 4.1.2), el primer receptor en ser caracterizado como diana farmacológica del glutamato. Posteriormente, otros receptores antes denominados no NMDAs, mostrarían mediar también en la señalización glutamatérgica: el receptor AMPA (ver apartado 4.1.2), y el receptor kainato. Estos receptores recibirían sus respectivos nombres de los análogos del glutamato por los que mostraron también una afinidad en diferentes estudios (ver en Watkins y Jane, 2006).

Posteriormente, a inicios de los 90 sería identificada una segunda familia de los receptores metabotrópicos de glutamato, distintos a los receptores acoplados a un canal iónico. Esta familia pertenece al grupo de receptores acoplados a proteínas G. La activación de estos receptores induce un cambio conformacional en su estructura, activando a su vez diferentes tipos de proteínas acopladas al mismo que, a consecuencia, dará lugar a una cascada de señalización intracelular a través de

diferentes mensajeros. De esta manera, funcionan como mediadores de la señal glutamatérgica de una forma más lenta que los receptores iónicos antes mencionados.

Esta señalización intracelular es específica para cada tipo de proteína a la que el receptor se encuentre acoplado, de esta manera se han identificado 8 subtipos diferentes de estos receptores, clasificados en 3 grupos (Niswender y Conn, 2010; figura 15). Los receptores del grupo 1 (mGluR1 y mGluR5), principalmente postsinápticos, modulan la señalización glutamatérgica a través del acoplamiento a proteínas Gq, seguidas de la activación de un segundo mensajero, la fosfolipasa C (PLC). Esta ruta estimula la liberación del Ca^{2+} que se encuentra almacenado a nivel intracelular. Los receptores del grupo 2 (mGluR2 y mGluR3), pre y postsinápticos, están vinculados a las proteínas Gi/o y su activación inhibe la actividad de la adenilil ciclasa (AC), lo que disminuye las concentraciones intracelulares de AMPc. Finalmente, el grupo 3 (mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8) estarían también vinculados a proteínas Gi/o y predominarían en el espacio presináptico. Cabe señalar que la actividad de estos receptores actuaría de forma complementaria a la activación de los NMDA, en la medida en que los mecanismos intracelulares inducidos, como la liberación de Ca^{2+} , contribuirían indirectamente a su activación.

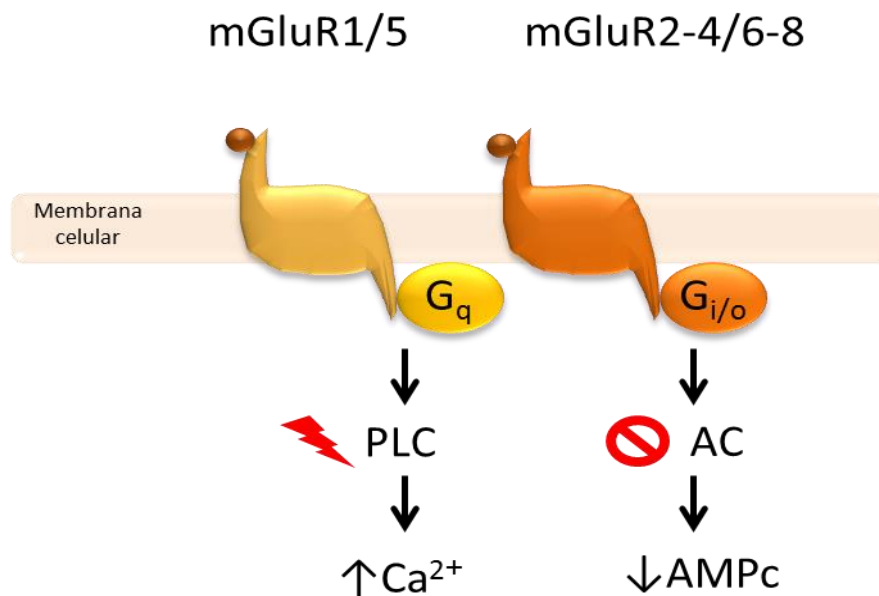


Figura 15. Representación esquemática de los receptores metabotrópicos de glutamato y sus rutas de señalización intracelular.

Una vez ejercida su acción en los receptores mencionados, el glutamato es transportado a la neurona mediante los transportadores de aminoácidos excitatorios de tipo C1 (EAAC1). Dentro de la misma, la enzima glutamina sintetasa, transforma el glutamato en glutamina, que a su vez es será utilizada para la síntesis de glutamato por medio de la enzima glutaminasa de tipo renal (KGA) o de tipo hepático (LGA).

4.3.1.1.1 El sistema Glutamatérgico y la neuroplasticidad

El papel de la señal glutamatérgica en procesos de neuroplasticidad y neurodegeneración comenzó a describirse pocos años después de que fuera identificado su rol como neurotransmisor. En primer lugar, se observó que un aumento en los niveles extracelulares de glutamato, con la consiguiente sobreactivación postsináptica de NMDA, desencadenaría un incremento sostenido de los niveles intracelulares de Ca^{2+} , una condición potencialmente tóxica para las células (Choi, 1992). Posteriormente, se observó que diferentes condiciones de exposición a estrés o la administración de glucocorticoides producían precisamente este marcado aumento en la señal glutamatérgica. Así, este mecanismo fue propuesto como uno de los principales mediadores en el efecto neurodegenerativo del SNC ante el estrés (Sapolsky, 1996). Pero al mismo tiempo, se observó que los procesos de potenciación sináptica a largo plazo implicados en el aprendizaje eran también dependientes de la señal glutamatérgica ejercida sobre los receptores NMDA (Bliss y Collingridge, 1993), y que estos efectos eran acompañados de procesos de remodelación sináptica y dendrítica (Matsuzaki et al., 2004).

La integración de estos estudios indicaba una participación dual de la señalización glutamatérgica en el balance neuroplasticidad/neurodegeneración (Hardingham y Bading, 2003). Así, por ejemplo, las diferentes localizaciones y/o isoformas de estos receptores repercutiría de forma distinta en la plasticidad y supervivencia neural (Hardingham et al., 2002; Yashiro y Philpot, 2008). Más recientemente, la activación de los receptores NMDA N2B han sido vinculada con procesos de excitotoxicidad y muerte celular, mientras que la activación de los NMDA N2A podrían facilitar procesos de neuroplasticidad y neuroprotección (Baez et al., 2018). Por último, también se identificaron otras vías de señalización glutamatérgica

vinculadas con procesos de neuroplasticidad, como la activación del receptor AMPA o de los receptores metabotrópicos de glutamato (ver en Abraham, 2008; Krugers et al., 2010).

Estos resultados indicarían que la señal glutamatérgica, ejercida a través de sus diferentes receptores, sería fundamental en el mantenimiento de procesos adaptativos de neuroplasticidad, mientras que una sobre señalización derivada de la exposición continuada a eventos de estrés, tendrían repercusiones negativas sobre esta, llegando incluso a mediar en procesos de excitotoxicidad, neurodegeneración y muerte celular. Además, cabe señalar que estas alteraciones plásticas presentarían cambios específicos en las diferentes regiones cerebrales (Popoli et al., 2011).

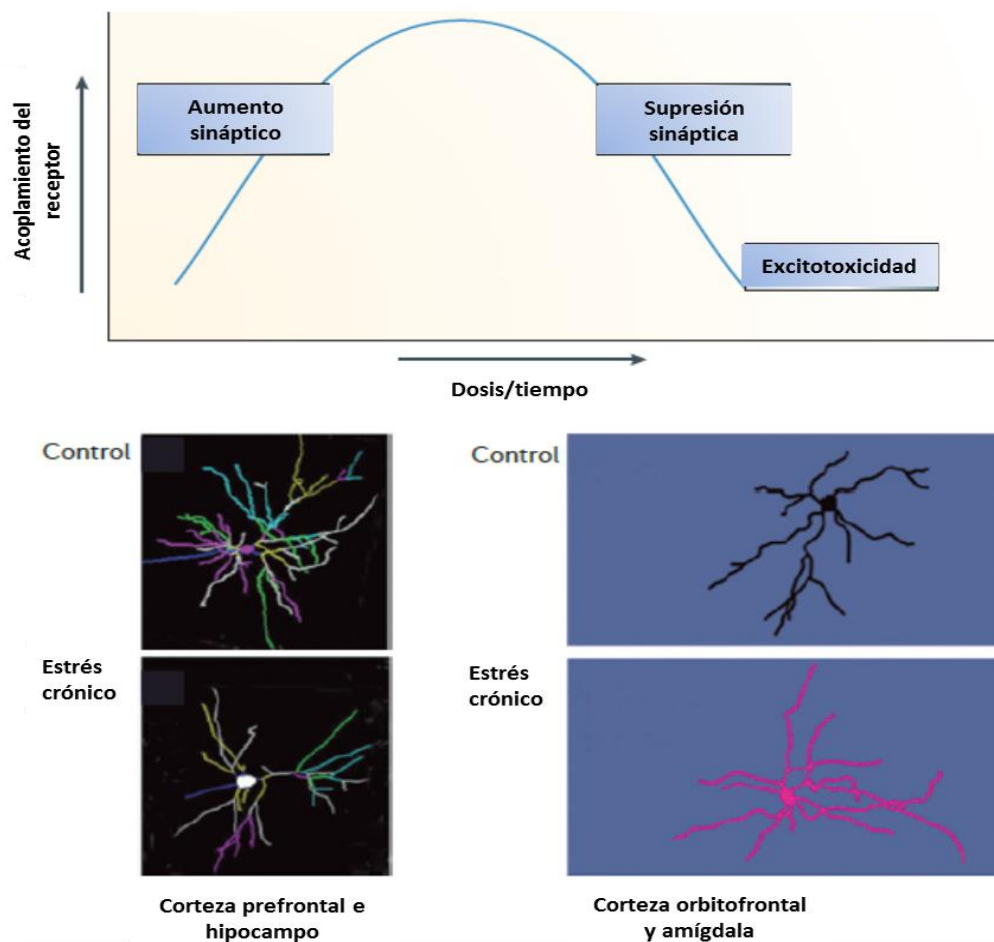


Figura 16. Arriba: Diferentes repercusiones que los efectos del estrés/administración de glucocorticoides y la señalización glutamatérgica ejercen sobre la plasticidad sináptica a lo largo del tiempo. Abajo: Efectos de la exposición a estrés crónico sobre la morfología de las neuronas de distintas regiones cerebrales. Modificado de Popoli et al., 2011.

4.3.1.1.2 Papel del sistema Glutamatérgico en el TUA

Como se indica en el apartado 4.1.3, el TUA constituye una remodelación estructural y funcional de diferentes regiones encefálicas. Estos cambios están mediados, además de otros sistemas, por alteraciones en la señalización glutamatérgica (Alasmari et al., 2018; Kalivas et al., 2009; Roberto y Varodayan, 2017). Las proyecciones glutamatérgicas procedentes de regiones como la CPF prefrontal y el HPC sobre estructuras como el ATV, la amígdala y el NAc suscitaron especial interés por su implicación en el efecto reforzante y los procesos de aprendizaje asociados al consumo de alcohol, y por otro lado, estas vías de señalización también resultaron ser un factor clave en otros componentes del ciclo adictivo, como el efecto negativo de la abstinencia y la motivación por la recuperación del consumo de alcohol (Kalivas y Volkow, 2005; Hwa et al., 2017).

Aunque el consumo agudo de alcohol inhibe la actividad glutamatérgica prefrontal (Kähkönen et al., 2003; Tu et al., 2007), esto resulta en un efecto directamente opuesto tras la exposición crónica, que puede incluso persistir en la abstinencia, tal como reflejarían modelos animales de TUA sometidos a una abstinencia prolongada (Hwa et al., 2015). Así, un estudio de resonancia magnética ha revelado que, tanto en pacientes de TUA como en animales expuestos al alcohol, la abstinencia induciría un aumento en los niveles cerebrales de glutamato (Hermann et al., 2012). De hecho, las alteraciones en la señal glutamatérgica ejercida sobre sus diferentes receptores han sido vinculadas con procesos de excitotoxicidad y neurodegeneración característicos de la abstinencia alcohólica (Gerace et al., 2019). Así se ha observado que este patrón en los niveles de glutamato se manifiesta de forma relativamente homogénea en otras estructuras como la amígdala (ver en Alasmari et al., 2018) y el HPC (Ward et al., 2009), tanto en la exposición crónica como durante la abstinencia (Dahchour y De Witte, 2003; Gass et al., 2011; Kryger y Wilce, 2010). Finalmente, cabe señalar que las alteraciones en la señal glutamatérgica hipocampal ha sido propuesta como un importante nexo en la comorbilidad del TUA y la depresión (Hermens et al., 2015).

Por otro lado, los modelos animales de TUA han mostrado que a nivel cortical, tiene lugar una reconfiguración en la expresión de los distintos receptores

glutamatérgicos, siendo el receptor NMDA especialmente sensible a estos cambios y cuya actividad podría subyacer a la motivación por recuperar el consumo (Gass et al., 2014; Kroener et al., 2012; Roberto y Varodayan, 2017; figura 17). De forma similar, los receptores glutamatérgicos muestran alteraciones en la amígdala ante el consumo crónico de alcohol. Concretamente, se han observado aumentos generalizados en la expresión y la activación de los receptores AMPA y NMDA, así como en algunos de los receptores glutamatérgicos metabotrópicos (ver en Alasmari et al., 2018). Por último, los receptores glutamatérgicos también se ven comprometidos ante el consumo crónico de alcohol a nivel hipocampal. Se ha observado un aumento en la actividad y la expresión del receptor NMDA (Smothers et al., 1997; Maler et al., 2005), así como alteraciones en la expresión de algunas subunidades del receptor AMPA (Brückner et al., 1997; Gerace et al., 2019), y en múltiples alteraciones en la expresión de los receptores metabotrópicos de glutamato (Gerace et al., 2019; Simonyi et al., 2014).

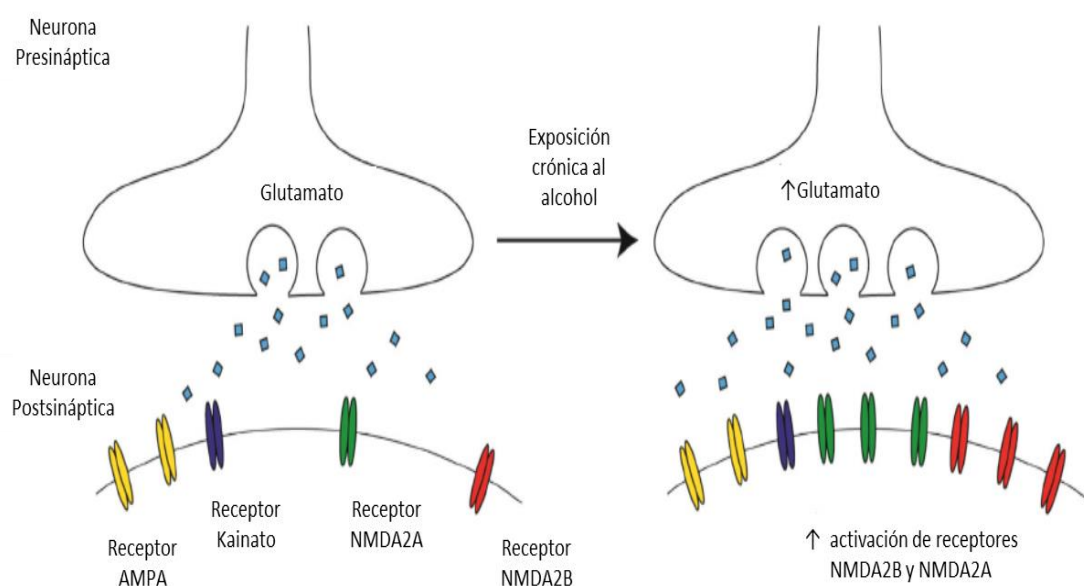


Figura 17. Representación esquemática de la reconfiguración en la disposición de receptores ionotrópicos de glutamato como consecuencia de la exposición crónica al alcohol. Modificado de Roberto y Varodayan, 2017.

Finalmente, se ha observado que el deseo por consumir alcohol (craving) durante la abstinencia estaría vinculado precisamente a los niveles de glutamato en pacientes de TUA (Frye et al., 2016a; Bauer et al., 2012). Mientras que, por otro lado, se ha observado que la inhibición de la actividad prefrontal (principalmente glutamatérgica) reduciría la autoadministración de alcohol en animales tras una

exposición crónica (Jaramillo et al., 2017). Teniendo en cuenta la eficacia del acamprosato en el TUA (Ray et al., 2018), el antagonismo del receptor NMDA, u otros receptores implicados en esta señalización, podrían ser mecanismos que contribuirían a paliar los efectos derivados de la excitotoxicidad presente en la abstinencia y que podrían prevenir la recaída en el consumo (Frye et al., 2016b; Goodwani et al., 2017). Como se describe en el siguiente apartado, este efecto podría ser similar al que indirectamente ejercerían los antidepresivos, y que podría explicar, en parte, el potencial de algunos antidepresivos para reducir el consumo de alcohol y mantener la abstinencia.

4.3.1.1.3 Papel del sistema Glutamatérgico en la depresión y el tratamiento antidepresivo

Diferentes estudios postmortem, de resonancia magnética, neuroimagen y en modelos animales han llevado a algunos autores a constatar que la señalización glutamatérgica y los procesos de neuroplasticidad se encontrarían alterados en la depresión, mientras que el tratamiento antidepresivo tendría el potencial de revertir estas alteraciones (ver en Duman et al., 1999; 2019; Musazzi et al., 2010; 2013; Sanacora et al., 2012).

En primer lugar, los pacientes depresivos han mostrado en general reducciones en el volumen de regiones específicas de encéfalo, concretamente en aquellas estructuras en las que predominarían las neuronas glutamatérgicas, y que, además, están relacionadas con funciones como la regulación del estrés y el estado de ánimo, como la CPF y el HPC (Koolschijn et al., 2009; Lorenzetti et al., 2009). Además, han presentado incrementos en los niveles cerebrales de glutamato (Hashimoto et al., 2007), aunque la evidencia acumulada por múltiples estudios indica que estos cambios podrían ser dependientes de las regiones encefálicas, al mostrar estos pacientes una reducción en los niveles en la CPF (Moriguchi et al., 2018). Finalmente, también han mostrado diferencias en la actividad, la expresión y la composición de los receptores NMDA, lo que ha llevado a sugerir que en pacientes depresivos tendría lugar una hipoactivación cortical en contraposición con una hiperactivación subcortical de la señal glutamatérgica (Hillhouse y Porter, 2015).

En segundo lugar, estudios en modelos animales expuestos a diferentes condiciones de estrés muestran, por un lado, alteraciones en la liberación y señalización de glutamato; un aumento en la misma en condiciones de estrés agudo, que, ante la cronicidad de la exposición al estrés, se mantendrían a nivel hipocampal pero no a nivel cortical, mientras que, por otro lado, los animales expuestos a condiciones de estrés crónico han mostrado reducciones en la arborización dendrítica, la formación de sinapsis y alteraciones volumétricas semejantes a las observadas en los pacientes con depresión. Ante estos resultados, varios autores han indicado que dependiendo de la intensidad y la duración del evento estresante, la consecuente variación en la señal glutamatérgica podría subyacer a las alteraciones en procesos de neuroplasticidad en patologías relacionadas con la exposición al estrés, como la depresión (ver en Musazzi et al., 2010; Popoli et al., 2011; Sanacora et al., 2012).

En tercer lugar, los estudios preclínicos farmacológicos han permitido una aproximación más completa de la implicación del sistema glutamatérgico en la depresión y la acción de los antidepresivos (Musazzi et al., 2013). Así, antidepresivos de diferentes mecanismos de acción podrían reducir la señalización glutamatérgica a nivel de la CPF (Bobula et al., 2003; Tokarski et al., 2008; Michael-Titus et al., 2000) y el HPC (Bonanno et al., 2005), más aún, mostrarían el potencial de revertir los aumentos en la liberación de glutamato inducidos por diferentes condiciones de estrés en los animales (Reznikov et al., 2007; Musazzi et al., 2010). Un efecto que, entre otros mecanismos, podría deberse a su capacidad para aumentar la señal monoaminérgica sobre sus receptores localizados a nivel presináptico en neuronas glutamatérgicas, resultando en una inhibición de la liberación de este neurotransmisor, para impedir finalmente una sobreactivación postsináptica de los receptores NMDA (Bonanno et al., 2005; Pittaluga et al., 2007).

En coherencia con estos resultados, los modelos animales de depresión han aportado evidencias de que el tratamiento antidepresivo actuaría sobre los distintos fenómenos de neuroplasticidad (Castrén y Hen, 2013) y revertiría el impacto inducido por el estrés crónico en la arborización dendrítica y sináptica, así como la densidad de las mismas en estructuras como la CPF y el HPC (Bessa et al., 2009; Hajszan et al., 2009; figura 18).

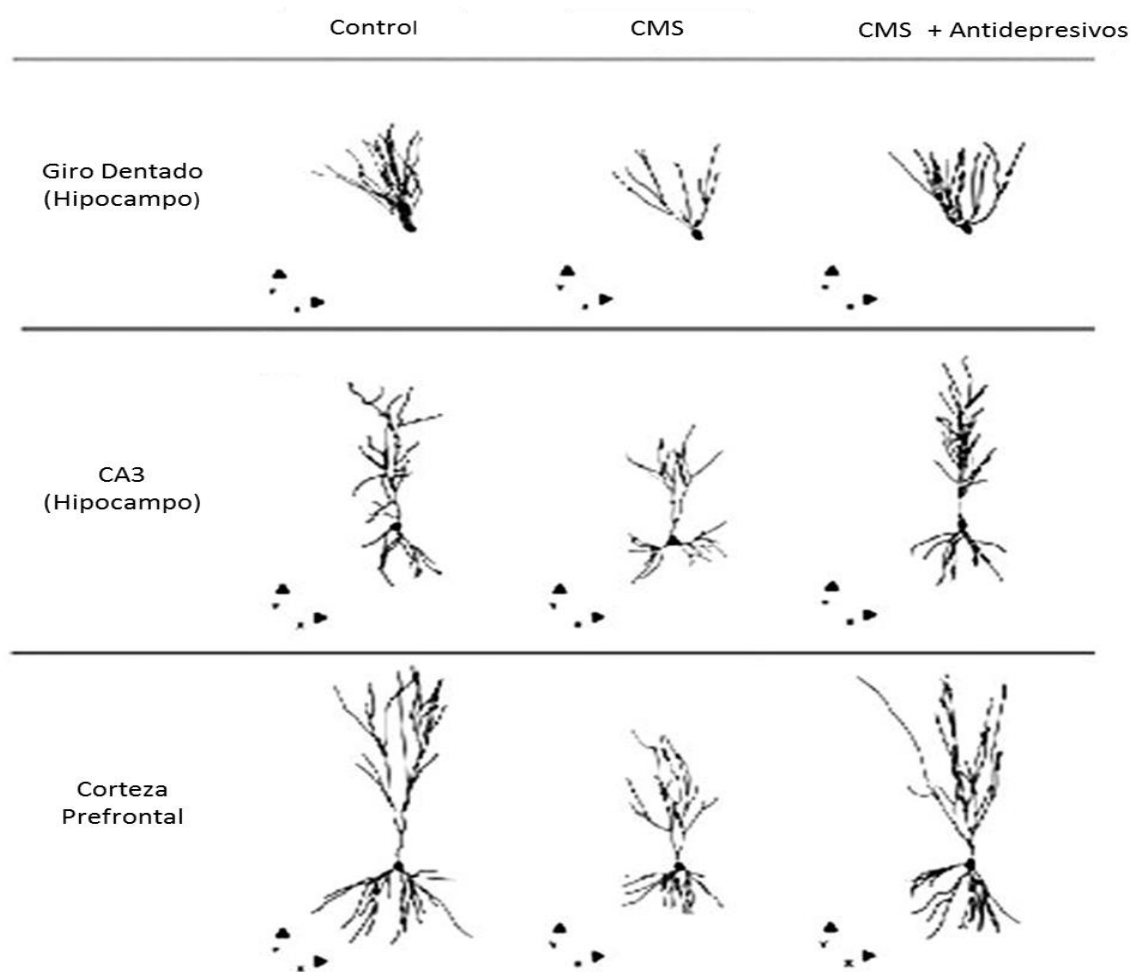


Figura 18. Remodelación dendrítica en neuronas del HPC y la CPF ante un protocolo de estrés crónico leve (CMS) y la reversión del mismo mediante el tratamiento crónico con antidepresivos. Modificado de Bessa et al., 2009.

Finalmente, y consolidando la participación del sistema glutamatérgico en la depresión y el efecto terapéutico del antidepresivo, algunos estudios revelaron que fármacos con un mecanismo de acción dirigidos específicamente a reducir la señalización glutamatérgica, como la ketamina, un antagonista parcial del receptor NMDA, mostrarían efectos terapéuticos similares a los observados en los antidepresivos en un intervalo más corto de tiempo (Berman et al., 2000; Trullas y Skolnick, 1990). Posteriormente, la memantina, con un mecanismo de acción similar, mostró efectos antidepresivos en pacientes con TUA y depresión similares a los encontrados en pacientes tratados con antidepresivos convencionales (Muhonen et al., 2008).

En conjunto, estos datos indicarían que una desestabilización de la señal glutamatérgica estaría acompañada, por un lado, de una interrupción de los procesos

de neuroplasticidad, y por otro, de un estado de excitotoxicidad celular que además contribuiría a un estado de neurodegeneración. En la depresión este efecto se traduciría en una hiperactividad glutamatérgica en regiones como el HPC y la amígdala, si bien en la CPF podría terminar manifestándose en un estado de hipoactivación. Por el contrario, el tratamiento antidepresivo podría restablecer un balance en la señalización excitatoria, promoviendo fenómenos adaptativos de neuroplasticidad en las distintas estructuras cerebrales que se traducirían en la recuperación funcional y el alivio de la sintomatología depresiva.

4.3.1.2 El sistema endocannabinoide (sEC)

Las investigaciones sobre el cannabis permitieron identificar, en primer lugar, que su principal componente psicoactivo, el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC), ejercía su acción sobre el SNC por medio de receptores específicos de membrana (Mechoulam, 1986; Howlett et al., 1986). De esta forma, fueron descritos los receptores denominados receptor cannabinoide 1 (CB1) (Devane et al., 1988) y el receptor cannabinoide 2 (CB2) (Munro et al., 1993) (Figura 19). Posteriormente, se confirmó la existencia de ligandos endógenos que también se acoplaban a dichos receptores, denominados endocannabinoides o cannabinoides endógenos (ECs), de entre los que destacan los dos principales; la araquidonoil etanolamida (anandamida o AEA) (Devane et al., 1992) y el 2-araquidonoil glicerol (2-AG) (Hanus et al., 2001) (Figura 20).

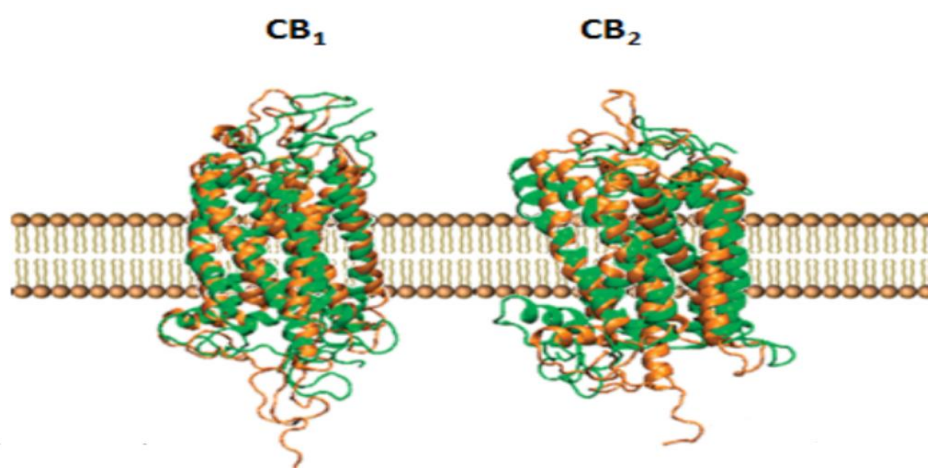


Figura 19. Estructura de los principales receptores cannabinoide, CB1 y CB2.

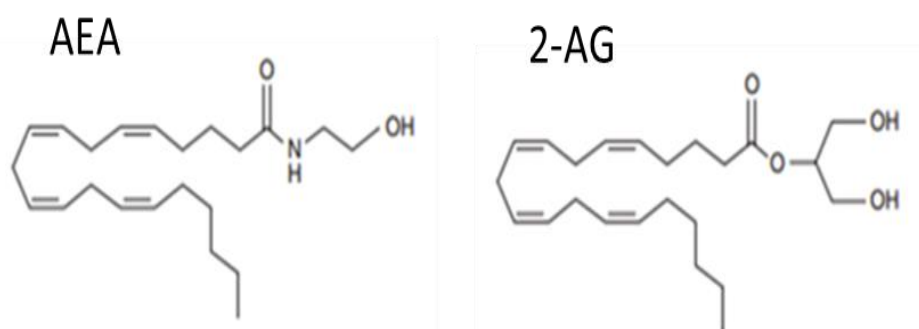


Figura 20. Estructura molecular de los dos principales ECs. La araquidonoil etanolamida (AEA o anandamida) y el 2-araquidonilglicerol (2-AG).

Finalmente, se identificaron las enzimas que permiten la degradación de los estos ligandos endógenos; la amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH) (Deutsch y Chin,

1993) y la monoacilglicerol lipasa (MAGL) (Dinh et al., 2002), así como las enzimas implicadas en su biosíntesis; la N-acil-fosfatidiletanolamina fosfolipasa D (NAPE-PLD) (Okamoto ET AL., 2004) y la diacilglicerol lipasa (DAGL α/β) (Bisogno et al., 2003). Todos estos componentes del sEC participan en gran variedad de funciones a nivel de SNC y sistema nervioso periférico tienen una amplia distribución en las diferentes estructuras cerebrales (Mechoulam y Parker, 2013).

Los ECs son moléculas lipídicas sintetizadas a demanda a partir de fosfolípidos de la membrana celular y cumplen una función reguladora de la sinapsis por medio de la neurotransmisión retrógrada (Freund et al., 2003). La síntesis y liberación de ECs se produce en respuesta a un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular (Maejima et al., 2005). Esta señalización intracelular activa las enzimas encargadas de sintetizar tanto el 2-AG como la AEA. El 2-AG se sintetiza a partir del diacilglicerol (DAG) por la actividad de DAGL α/β , mientras que la AEA lo genera a partir de la N-acil-fosfatidiletanolamina (NAPE) por la actividad de NAPE-PLD (Figura 21). Finalizada su acción, los ECs serán biodegradados por las enzimas FAAH y MAGL en la neurona presináptica, generando ácido araquidónico y etanolamina y glicerol, respectivamente (Figura 21).

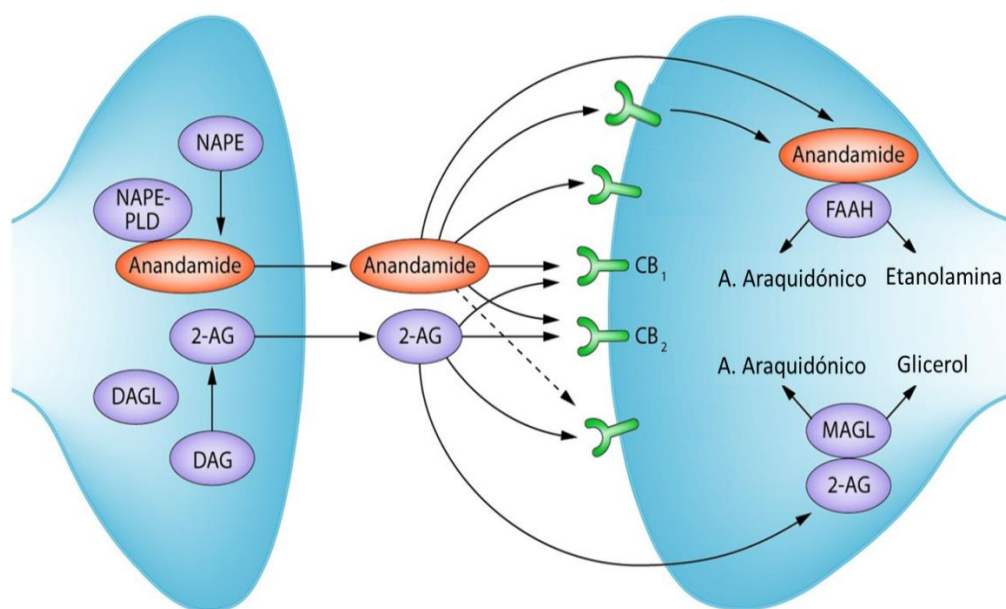


Figura 21. Esquema de la biosíntesis y degradación de los dos principales ECs. Modificado de Lafreniere y Kelly, 2018. 2-AG: 2-araquidonil glicerol; CB1: Receptor cannabinoide 1; CB2: Receptor cannabinoide 2; DAGL: diacilglicerol lipasa; FAAH: Amidohidrolasa de ácidos grasos; MAGL: Monoacil glicerol lipasa; NAPE-PLD: N-acil-fosfatidiletanolamina fosfolipasa D.

Una vez sintetizados, los ECs atraviesan la membrana celular y viajan con carácter retrógrado hasta la neurona presináptica, e incluso, hasta células pertenecientes al sistema inmune como los astrocitos, donde activarán receptores específicos. El receptor CB1 está caracterizado como un receptor presináptico, acoplado al complejo de proteína Gi/o y se encuentra ampliamente distribuido en multitud de regiones del encéfalo (Glass et al., 1997; Tsou et al., 1998). El receptor CB2, también acoplado al complejo de proteína Gi/o, no exclusivamente presináptico, tiene una distribución amplia a nivel de sistema nervioso periférico y en los componentes del sistema inmunológico, si bien posteriormente sería detectado también a nivel de SNC (Van Sickle et al., 2005), concretamente, en regiones como el HPC, la CPF o la amígdala (Gong et al., 2006), e incluso en neuronas dopaminérgicas del ATV (Zhang et al., 2016). La activación de estos receptores por medio de los ECs desencadena una serie de mecanismos de señalización intracelular mediante la inhibición de la AC y controlando la permeabilidad de canales de K^+ y Ca^{2+} . Esta señalización intracelular está ligada a la inhibición de la liberación de neurotransmisores como el GABA o el glutamato (Howlett et al., 2002; Figura 22).

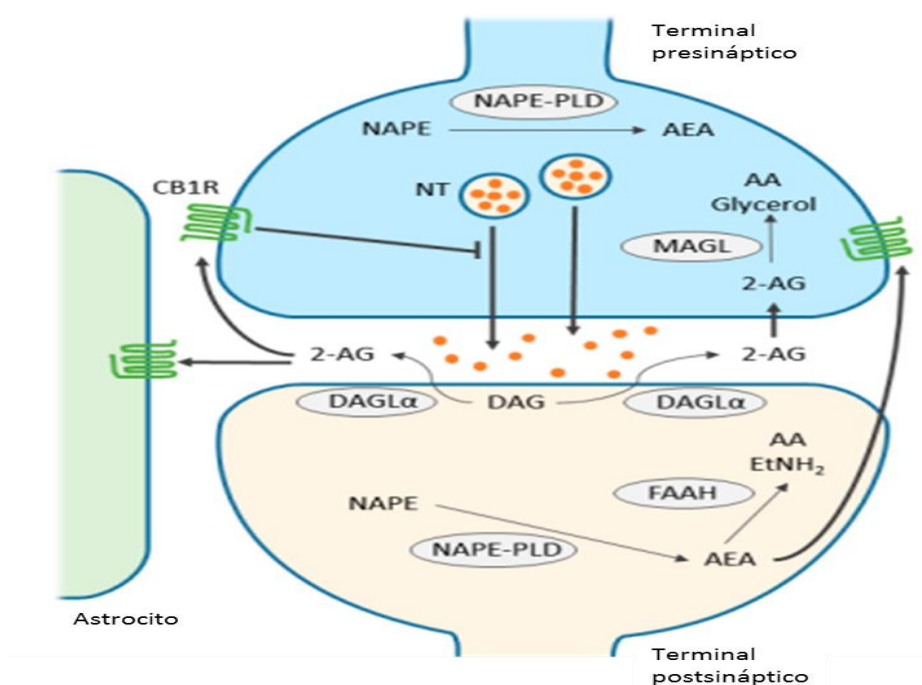


Figura 22. Representación esquemática de la regulación sináptica mediada por la transmisión retrógrada del sEC. Modificado de Zou y Kumar, 2018. 2-AG: 2-araquidonoil glicerol; AEA: Anandamida; CB1: Receptor cannabinoide 1; DAGLα: diacilglicerol lipasa α; FAAH: Amidohidrolasa de ácidos grasos; MAGL: Monoacil glicerol lipasa; NAPE-PLD: N-acil-fosfatidiletanolamina fosfolipasa D.

Además de los receptores CB1 y CB2, investigaciones posteriores han ido desvelando múltiples mecanismos por los que la señalización de ECs ejercería su acción. Así, se detectó el potencial de los ECs para activar otras dianas distintas, como el receptor acoplado a proteína G 55 (GPR55) (Lauckner et al., 2008), el receptor de potencial transitorio vaniloide 1 (TPRV1) (Ross, 2003), y las isoformas α y γ del receptor activado por proliferador de peroxisoma (PPAR α/γ) (ver en O'Sullivan, 2007; 2016). Los PPAR son receptores esteroideos localizados en el núcleo celular y que, al ser activados, actúan como factores de transcripción, regulando la expresión de genes, por lo que están implicados en múltiples procesos metabólicos y de diferenciación celular que podrían estar mediando en algunos de los efectos fisiológicos de la señalización EC (O'Sullivan, 2016). Estos receptores son activables por una familia de moléculas denominadas aciletanolamidas, como la oleiletanolamida o la palmitoleiletanolamida (O'Sullivan, 2016), que están estrechamente vinculadas con los ECs y su sistema de señalización, con los que compartirían rutas de degradación enzimática. Así, por ejemplo, las alteraciones en la actividad de algunas rutas metabólicas de ECs, como la de la enzima FAAH, podrían repercutir en la activación de los PPAR (Mazzola et al., 2009).

4.3.1.2.1 Papel del sEC en el TUA

Debido a la relevancia del sEC en el SNC por su papel modulador de la comunicación neural, las investigaciones sobre su participación en trastornos neuropsicológicos y neurodegenerativos continúa siendo objeto de gran interés. De entre ellos, el estudio de la fisiopatología de la adicción sería quizás uno de los más estudiados en relación al sEC (Manzanares et al., 2018). Como se ha mencionado anteriormente, el sEC extiende su acción a lo largo de todo el SNC, y ejerce su acción neuromoduladora en regiones del encéfalo esenciales en la fisiopatología de la adicción como la CPF, el HPC o la amígdala (Koob y Volkow, 2009).

Por un lado, estudios preclínicos muestran, en primer lugar, que la exposición aguda a alcohol induce una disminución del tono EC en diferentes regiones del encéfalo (Ferrer et al., 2007; Rubio et al., 2009), mientras que la exposición crónica induciría un efecto opuesto (González et al., 2004). En segundo lugar, esta condición

estaría acompañada de reducciones en la expresión y/o la activación del receptor CB1 así como de las enzimas de degradación de ECs (Ceccarini et al., 2013; Mitirattanakul et al., 2007; Ortiz et al., 2004; Robinson et al., 2015; Serrano et al., 2012), lo que podría mantenerse en estadios tempranos de la abstinencia, dando lugar a una regulación a la alza de este receptor en estadios avanzados de la misma en estructuras como el HPC (Mitirattanakul et al., 2007) y la CPF (Rimondini et al., 2002; Vinod et al., 2006). Los autores han señalado que el aumento en la liberación de ECs en la abstinencia temprana podría estar vinculado al estado de hiperexcitabilidad glutamatérgica característico de la abstinencia alcohólica que se ha descrito anteriormente, mientras que la abstinencia prolongada pondría en marcha mecanismos compensatorios de sobreexpresión de CB1 y de activación de enzimas encargadas de la degradación de ECs, como la FAAH (Pava y Woodward, 2012; figura 23). Estos datos coincidirían parcialmente con las observaciones obtenidas en estudios en pacientes con TUA, que mostraban una reducción de la actividad y la expresión de CB1 y de algunas enzimas encargadas de la degradación de ECs como consecuencia del consumo crónico de alcohol persistentes aún después de un mes de abstinencia (Ceccarini et al., 2014; Erdozain et al., 2015; Vinod et al., 2010).

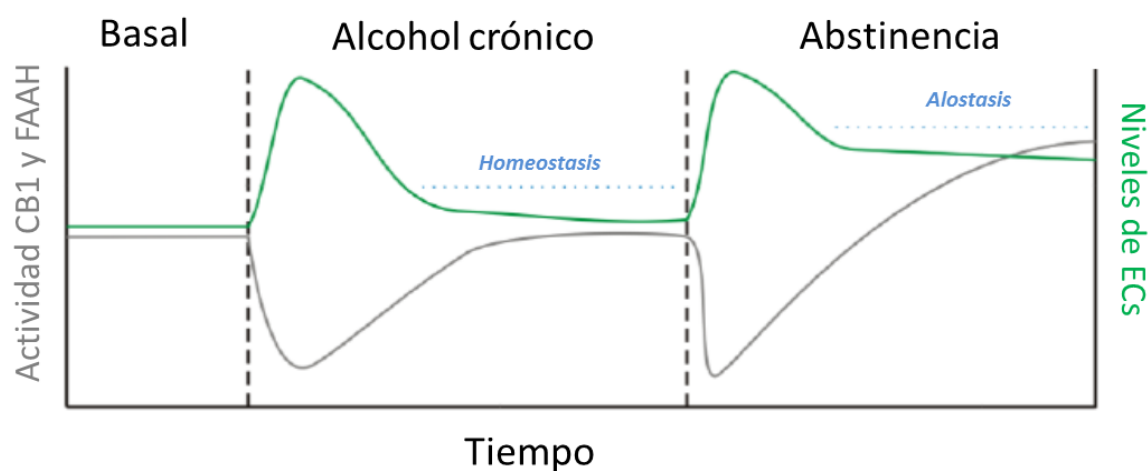


Figura 23. Representación gráfica de la reconfiguración del sEC a lo largo de los estadios del TUA. Modificado de Pava y Woodward, 2012.

Por otro lado, estudios preclínicos han señalado que la reconfiguración del receptor CB1 y las alteraciones en el tono de ECs tendría un papel determinante tanto en el efecto reforzante del alcohol como en la vulnerabilidad a retomar el consumo durante la abstinencia (González et al., 2004). No obstante, dada la compleja

naturaleza del ciclo adictivo y del papel de la señalización de ECs sobre la motivación por consumir alcohol, actualmente existen dudas sobre cuáles de las alteraciones del sistema forman parte de la fisiopatología del TUA, contribuyendo a un estado de vulnerabilidad, y cuáles conformarían un mecanismo protector ante el mismo (Henderson-Redmond et al., 2016).

A este respecto, los estudios preclínicos farmacológicos indicarían que la activación de CB1 contribuiría al efecto reforzante del alcohol al mediar en la señal dopaminérgica sobre el NAc que tendría lugar ante el consumo (Cheer et al., 2007). Esta función se extendería a la totalidad del ciclo adictivo, ya que, por un lado, su activación también resultaría determinante en la motivación por retomar el consumo en la abstinencia (Alén et al., 2008; López-Moreno et al., 2004) y, por otro lado, el uso de antagonistas CB1 podría revertir este efecto, reduciendo el consumo (Cippitelli et al., 2005; Economidou et al., 2006). Aunque estos hallazgos indicarían que la señal de los ECs ejercida sobre CB1 incrementaría el consumo, otras intervenciones farmacológicas indican que la señalización de ECs desempeñaría un papel más complejo sobre el TUA. Así, varios estudios muestran que la inhibición de la degradación de ECs no incrementaría (Cippitelli et al., 2007) e incluso disminuiría el consumo de alcohol (Figueiredo et al., 2017; Zhou et al., 2017), algo que algunos autores atribuirían a su potencial para paliar la vulnerabilidad a la recaída derivada del componente afectivo negativo emergente durante la abstinencia como consecuencia de un déficit en la señal de ECs (Ceccarini et al., 2014; Serrano et al., 2018). Estos datos indicarían que el restablecimiento del tono de ECs podría ser un mecanismo más eficiente que el antagonismo del receptor CB1 para mantener la abstinencia cuando la motivación por recaer en el consumo estuviera ligada al componente afectivo negativo inducido ante el cese del consumo, y podrían explicar en parte que los pacientes con TUA con esta condición no se hayan visto beneficiados del tratamiento con rimonabant (Soyka et al., 2008; George et al., 2010).

Aunque el receptor CB1 ha atraído la mayor parte del interés de la investigación por su participación sobre el consumo de alcohol, la detección de los receptores CB2 en regiones cerebrales implicadas en la adicción abrió paso a las investigaciones sobre su implicación en el abuso de sustancias, cuyo interés ha ido en aumento en la última década (Gong et al., 2006; Onaivi et al., 2008a; 2008b;

Manzanares et al., 2018). De esta forma, recientemente se ha observado que las alteraciones en la actividad y la expresión génica del receptor CB2 también han resultado ser determinantes en la vulnerabilidad en el consumo de alcohol (Al Mansouri et al., 2014; Ishiguro et al., 2007; Navarrete et al., 2018; Ortega-Álvaro et al., 2015).

Como se ha comentado anteriormente, compuestos muy relacionados con los ECs activarían otro tipo de receptores, como los PPAR. Además, se ha estudiado el potencial de la activación de PPAR α como un mecanismo que podría reducir el consumo de alcohol (Haile y Kosten, 2017; Bilbao et al., 2016), y podrían estar mediando en los efectos anti-inflamatorios y antidepresivos observados en animales expuestos al alcohol a los que se les administró oleiletanolamida, uno de sus principales ligandos (Antón et al., 2017).

En conjunto, estos datos indican que el sEC atravesaría diferentes mecanismos de disregulación y compensación a lo largo del ciclo del TUA. Estos cambios podrían culminar en un estado de desactivación de su función neuromoduladora, confeccionando un marco general de neurotransmisión que contribuiría a la recaída en el consumo de alcohol. Por otro lado, el restablecimiento de la señal EC contribuiría indirectamente a la modulación de la transmisión de otros sistemas implicados en el TUA, como el sistema glutamatérgico, reduciendo el impacto que tendría el estado afectivo negativo sobre el riesgo de retomar el consumo.

4.3.1.2.2 Papel del sEC en la depresión y el tratamiento antidepresivo

El papel regulador en la transmisión neural del sEC en regiones como el HPC, y la CPF ha acentuado el interés por conocer su participación en la fisiopatología y la recuperación de múltiples trastornos del estado de ánimo, como la depresión (Araque et al., 2017; Esteban y García-Sevilla, 2012; Gorzalka y Hill, 2011; Micale et al., 2013; Van Bockstaele, 2012). Teniendo en cuenta el efecto ansiolítico y euforizante del consumo de cannabis, y la acción del Δ^9 -THC sobre el receptor CB1, se planteó que, alternativamente, una hipoactivación de este receptor, ligada posiblemente a una disminución del tono EC, podría subyacer a la depresión (Hill y Gorzalka, 2005a).

Así, el receptor CB1 ha sido uno de los más estudiados en relación con la depresión. Diferentes estudios preclínicos han mostrado que las alteraciones en la señalización CB1 inducían en los animales unas condiciones y estados fisiológicos similares a las presentados en pacientes depresivos (ver en Gorzalka y Hill, 2011). Por otro lado, los resultados de los ensayos clínicos con rimonabant, un antagonista CB1, mostraron que dicho tratamiento farmacológico inducía síntomas de depresión y ansiedad en los pacientes (Christensen et al., 2007). Además, estudios postmortem han mostrado aumentos en la expresión de este receptor a nivel cortical en pacientes depresivos y suicidas con TUA (Hungund et al., 2004; Vinod et al., 2005). Aunque es algo que está por determinar, esta reconfiguración de CB1 podría reflejar un mecanismo de compensación ante una desactivación de la señal de ECs, lo que convergería con diferentes estudios que indicarían que los pacientes con depresión muestran reducciones en los niveles periféricos de ECs (Hill et al., 2008a; 2009), algo similar a lo observado en los niveles de ECs en regiones como la CPF y el HPC en modelos animales de depresión (Hill et al., 2008b; Smaga et al., 2017a).

Por otro lado, estudios farmacológicos indican que el sEC podría mediar en el efecto terapéutico del tratamiento antidepresivo. Así, los antidepresivos han mostrado el potencial de aumentar los niveles periféricos de ECs en pacientes depresivos (Romero-Sanchiz et al., 2019). Además, estudios preclínicos han mostrado que los antidepresivos, mediante mecanismos que permanecen por esclarecer, inducirían también aumentos en los niveles de ECs hipocampales (Smaga et al., 2014), así como aumentos en la expresión de los receptores CB1 y CB2 en el HPC y la CPF (Hill et al., 2008b; Smaga et al., 2017b), siendo estos cambios en la configuración de receptores un posible mecanismo resultante del aumento del tono EC inducido por el tratamiento. De hecho, los modelos animales de depresión han mostrado que el tratamiento antidepresivo podría revertir algunos de los cambios en el sEC inducidos por condiciones de estrés crónico, como el aumento en la expresión prefrontal de CB1 (Hill et al., 2008c), una condición similar a la que reflejarían estudios postmortem en pacientes tratados con antidepresivos (Koethe et al., 2007; Mato et al., 2018). En este sentido, otros estudios han utilizado fármacos inhibidores de la actividad de las enzimas responsables de la degradación de ECs obteniendo resultados terapéuticos

similares a los mostrados por el tratamiento antidepresivo (ver en Ogawa y Kunugi, 2015).

Finalmente, varios ensayos clínicos han indicado el potencial que la activación del PPAR, posiblemente mediada por algunos de sus ligandos, como la oleiletanolamida (Romero-Sanchiz et al., 2019), tendría sobre pacientes con depresión (ver en Colle et al., 2017), algo que, según muestra la evidencia preclínica, posiblemente estaría vinculado a su participación en el efecto terapéutico del antidepresivo (Romero-Sanchiz et al., 2019; Song et al., 2018).

En conjunto, estos datos indicarían, en términos generales, que la depresión presentaría una desactivación de la señalización de ECs, además de una reconfiguración en la expresión y actividad del receptor CB1. Teniendo en cuenta la función de regulación sináptica de este sistema, cabe señalar que la disregulación de otros sistemas de neurotransmisión, como los estados de hiperactivación glutamatérgica antes mencionados, podrían de alguna manera estar relacionadas con un deterioro de la función neuromoduladora del sEC. Por otro lado, el tratamiento antidepresivo podría restablecer esta función, actuando así indirectamente sobre otros sistemas alterados y contribuyendo a su efecto terapéutico.

4.3.1.3 La neurogénesis adulta del hipocampo

A principios del siglo XX, el hallazgo de células en división en el encéfalo en roedores rompió con uno de los dogmas centrales de la neurociencia (Allen, 1912). A diferencia de la perspectiva estática e inmutable del SNC adulto, se observó que, a lo largo de la vida, el cerebro de diferentes especies de mamíferos continuaría generando nuevas células gliales y neuronas en regiones específicas, como la sección inferior de los ventrículos laterales y la zona subgranular del giro dentado del HPC (Altman y Das 1965a; 1965b). Posteriormente, estudios postmortem y de neuroimagen confirmarían que este fenómeno tenía lugar de forma similar en los seres humanos adultos. Así, la utilización de nuevas tecnologías en la detección de la neurogénesis en humanos, como la datación mediante ^{14}C , ha llevado a algunos autores a estimar que cerca de 700 neuronas se incorporarían diariamente a la circuitería del cerebro humano de mediana edad (Spalding et al., 2013).

La generación de nuevas neuronas en el HPC durante la edad adulta comprende un proceso complejo que comienza con la proliferación celular y culmina con la integración funcional de una neurona que ha alcanzado un periodo de maduración. Así, se han identificado diferentes estadios u eventos de este fenómeno que pueden identificarse mediante marcadores celulares específicos (ver en Balu y Lucki, 2008, y en figura 1 de anexo 3). La etapa de proliferación tiene lugar como consecuencia de un proceso de división de las células madre, que tienen el potencial de dar lugar a diferentes linajes celulares, entre los que se encuentran las células progenitoras de neuronas o neuroblastos (Weissman et al., 2001). Posteriormente, los diferentes tipos de células progenitoras (2a, 2b y 3) atraviesan un ciclo celular que termina en la generación de una neurona inmadura, que se desplaza a lo largo de la capa granular del giro dentado y completa los estadios de maduración temprana y tardía. La maduración de estas células incluye procesos de expresión de distintas proteínas que permiten el desarrollo de axones y dendritas, así como el establecimiento de sinapsis que permiten la transmisión GABAérgica y glutamatérgica. Finalmente, la etapa de maduración culmina con la integración de la nueva neurona en el circuito neural hipocampal.

Existen múltiples factores de regulación que intervienen en la neurogénesis del HPC. La integración de diferentes estudios ha llevado a algunos autores a indicar que el envejecimiento o el estrés crónico podrían repercutir negativamente en la formación de nuevas neuronas, mientras que el ejercicio físico constituiría un factor potenciador de la neurogénesis (ver en Baptista y Andrade, 2018). Desde una perspectiva neurobiológica, los estudios preclínicos indicarían que esta modulación en los procesos de neurogénesis estaría relacionada con los sistemas de señalización glutamatérgico, monoaminérgico y EC, así como por factores de crecimiento neural, como el factor neurotrófico derivado del cerebro (ver en Balu y Lucki, 2008).

La implicación funcional de la incorporación de nuevas neuronas en el HPC adulto ha generado un gran interés por la investigación biomédica. Así, diferentes estudios preclínicos revelan que la neurogénesis podría mediar, desde un plano cognitivo y emocional, en las diferentes funciones dependientes del HPC, como el aprendizaje, la memoria y la regulación del estrés y el estado de ánimo (Baptista y Andrade, 2018). Además, los autores sugieren que esto tendría una repercusión

significativa en diferentes patologías neuropsiquiátricas en las que estas funciones se verían comprometidas. . Profundizar en este aspecto es algo que resultaría de especial interés actualmente, cuando estudios recientes han reabierto el debate sobre hasta qué punto la neurogénesis en el HPC humano adulto persistiría a lo largo de la vida y en qué medida contribuiría la incorporación de nuevas neuronas a los procesos cognitivos y de neuroplasticidad cerebral (Boldrini et al., 2018; Kempermann et al., 2018; Snyder, 2019).

4.3.1.3.1 Papel de la neurogénesis del hipocampo en el TUA

Diferentes estudios preclínicos han indicado que el alcohol produce efectos tóxicos sobre las neuronas del HPC. Posteriormente, varios estudios mostraron que estos efectos estarían relacionados con una inhibición de la proliferación, la diferenciación y la supervivencia de las nuevas neuronas en el HPC (Ver Xu et al., 2015). Recientemente, un estudio postmortem ha detectado alteraciones en parámetros de proliferación y maduración de nuevas neuronas en el HPC de pacientes con TUA similares a los observados previamente en animales (Le Maître et al., 2018).

Si bien la exposición al alcohol parece inducir un efecto negativo sobre los parámetros de neurogénesis, los estudios preclínicos muestran que durante la abstinencia temprana se producirían eventos espontáneos o reactivos en dichos parámetros, especialmente en marcadores de proliferación neural (ver en Olsufka et al., 2018). Teniendo en cuenta que la preservación o la inducción de la neurogénesis hipocampal podría suponer un factor de protección en el trastorno adictivo (Chambers, 2013; Mandyam y Koob, 2012), este efecto ha atraído el interés de algunos autores, y ha sido propuesto como un posible mecanismo de compensación ante el impacto de la exposición al alcohol (Olsufka et al., 2018). Por otro lado, los estudios que han evaluado el efecto de la exposición al alcohol sobre parámetros de neurogénesis en etapas avanzadas de la abstinencia muestran una reducción mantenida en la mayoría de estos parámetros (ver en Olsufka et al., 2018), algo que, según la hipótesis inicial, constituiría un factor de vulnerabilidad en la recaída. La integración de estos resultados lleva a cuestionar cuál es el papel que la neurogénesis desempeñaría en el ciclo adictivo,

especialmente en la medida en que este fenómeno participaría sobre la motivación por retomar el consumo.

4.3.1.3.2 Papel de la neurogénesis del hipocampo en la depresión y el tratamiento antidepresivo

La teoría de la neuroplasticidad de la depresión sostiene que, dentro de los distintos niveles que contribuyen a la plasticidad cerebral, la incorporación funcional de nuevas neuronas en el HPC representaría un elemento importante en la depresión, especialmente en la recuperación mediada por el tratamiento crónico antidepresivo (Castrén y Hen, 2013. Tanti y Belzung, 2013; Eliwa et al., 2017).

Así, estudios preclínicos han mostrado que el tratamiento crónico con antidepresivos induce un aumento en parámetros (principalmente de proliferación y maduración neural) de neurogénesis en el HPC (Malberg et al., 2000), e incluso podría revertir el impacto sobre la neurogénesis hipocampal en animales sometidos a estrés crónico, contribuyendo además a los efectos observados en la conducta de tipo depresivo y/o ansioso de estos animales (ver en Tanti y Belzung, 2013; Mahar et al., 2014). De forma similar, los estudios clínicos indican que los pacientes que recibieron tratamiento farmacológico antidepresivo mostrarían indicios de un incremento en la neurogénesis hipocampal en comparación con los pacientes no medicados (Boldrini et al., 2009; 2012; 2013; 2014).

La demora en la respuesta al antidepresivo se correspondería con el tiempo que requieren las nuevas neuronas para madurar e integrarse en la circuitería hipocampal, y además, el hecho de que algunos fármacos con efectos antidepresivos, como la ketamina, también promuevan la neurogénesis, serían indicadores de una participación importante de este fenómeno en el efecto terapéutico del tratamiento. Según la evidencia disponible, esto sería especialmente determinante en patologías con un componente de estrés que conllevara un deterioro estructural y funcional del HPC (Eliwa et al., 2017). No obstante, los hallazgos recientes reclaman un mayor número de estudios que permitan ahondar en esta cuestión.

4.4 Antidepresivos en el TUA y la depresión

Las condiciones de comorbilidad, especialmente trastornos del estado de ánimo, suponen una variable fundamental a tener en cuenta a la hora de la elección del tratamiento farmacológico en el TUA, (Kim et al., 2018; Pettinati et al., 2013), sobre todo teniendo en cuenta que precisamente esta condición sería una de las que ha mostrado repercutir negativamente sobre la recaída de forma más contundente (Sliedrechta et al., 2019).

Como se ha mencionado, el alcohol presenta múltiples dianas farmacológicas y son diversos los sistemas de neurotransmisión que tendrían un potencial terapéutico en el TUA. Debido a la extensa evidencia empírica que respaldaría la existencia de alteraciones en la transmisión monoaminérgica (especialmente 5-HT) como un importante componente en la comorbilidad de ambos trastornos, el tratamiento farmacológico antidepresivo utilizado en estos casos estaría enfocado en tratar de restablecer dicha señalización (Belmer et al., 2016). Así, de entre las alternativas farmacológicas en casos de comorbilidad psiquiátrica, la utilización del tratamiento antidepresivo en pacientes con TUA sería quizás una de las más relevantes. Desafortunadamente, y aunque esta condición lleva siendo abordada desde hace décadas, la evidencia empírica que respalda la eficacia del tratamiento farmacológico en condiciones de comorbilidad es, hasta la fecha, insuficiente (Hillemacher y Frieling, 2019; Naglich et al., 2017). Por esta razón, este trabajo abordará el estado actual del tratamiento farmacológico antidepresivo en el curso del TUA, tratando de aportar información relevante que facilite la futura implementación del tratamiento óptimo en estos pacientes.

4.4.1 Evidencia clínica en la comorbilidad TUA-depresión

En la década de los 70, los pacientes alcohólicos que presentaban depresión ya eran tratados con antidepresivos, pero los estudios dirigidos a la comprobación de su eficacia mostraron que esta sería escasa o nula. No obstante, estos estudios presentaron muchas dificultades para poder establecer el tratamiento antidepresivo de forma adecuada, ya fuera por un uso incorrecto de la medicación por parte de los

pacientes o por las interacciones metabólicas que el consumo elevado de alcohol ejercía sobre la biodisponibilidad de algunos antidepresivos, como los ATCs (Pettinati et al., 2013).

Posteriormente se realizaron ensayos clínicos aleatorizados que trataban de evitar los problemas metodológicos de estudios anteriores y que evaluaban la eficacia del antidepresivo en comparación con el efecto de un placebo. A pesar de las décadas de investigación, el número de ensayos clínicos que contemplan condiciones de comorbilidad psiquiátrica es relativamente escaso, lo que posiblemente contribuye a que la evidencia sobre la eficacia del tratamiento antidepresivo en el TUA sea aún inconsistente. Varios autores han analizado sistemáticamente los resultados de estos ensayos clínicos con la intención de esclarecer la eficacia del tratamiento antidepresivo llegando a conclusiones similares (Foulds et al., 2015a; Iovieno et al., 2011; Nunes y Levin, 2004; Torrens et al., 2005). En una buena parte de los pacientes el tratamiento paliaba la sintomatología depresiva, pero solo en algunos ensayos se apreció también una mejora significativa en el curso del TUA. El más reciente de los meta-análisis disponibles en relación a la eficacia del antidepresivo en el TUA y la depresión indica, por un lado, que el antidepresivo sí parece tener una repercusión positiva en algunos aspectos del curso de la depresión y del TUA, pero al mismo tiempo, que son aún importantes las barreras metodológicas que dificultan integrar los resultados de los muy diversos ensayos para poder extraer conclusiones realmente fiables acerca de la eficacia del tratamiento en estos pacientes (Agabio et al., 2018). Un enfoque pormenorizado de los meta-análisis nos revelaría que, dentro de los múltiples aspectos que podrían estar enmascarando la obtención de información sobre la eficacia general de los antidepresivos, cabría destacar:

1. Las diferencias relativas al método de evaluación del curso del TUA y la depresión: Los autores del meta-análisis más reciente ponen de manifiesto la falta de consenso entre ensayos a la hora de escoger las medidas e indicadores en que se basaría el curso de ambas patologías y, además, señalan que varios ensayos se centrarían específicamente en la progresión de una de ellas, perdiéndose información relevante y necesaria

para consolidar la evidencia sobre la eficacia del tratamiento (Agabio et al., 2018).

2. Las diferencias relativas a los tipos de pacientes: Algunos autores han señalado que las diferentes relaciones causales entre la depresión y el TUA y/o la severidad del TUA pueden repercutir en la respuesta al tratamiento antidepresivo (Babor et al., 1992; Schuckit et al., 1997). Los primeros datos parecían indicar que los pacientes con depresión independiente se beneficiarían más del tratamiento, mientras que los pacientes con depresión inducida lo harían más ante una reducción del consumo del alcohol (Schuckit, 2006). No obstante, estudios posteriores no encontrarían tales diferencias, y además señalan que la reducción en el consumo de alcohol sería un factor determinante en la respuesta al tratamiento en ambos tipos de pacientes (Foulds et al., 2015a). Esto estaría en coherencia con el estudio más reciente que evaluó la respuesta al tratamiento de ISRS en función del subtipo de depresión presente en pacientes con TUA, indicando que la depresión inducida por el alcohol mostraría una mejor respuesta al tratamiento antidepresivo a corto plazo en comparación con los pacientes con depresión independiente, una mejoría que los autores asociaron a una mayor reducción del consumo de alcohol en estos pacientes (Foulds et al., 2015b). Teniendo en cuenta, además, que la sintomatología depresiva cursa a menudo con un TUA de una severidad mayor (Babor et al., 1992; Ehlers et al., 2019; Tam et al., 2014), el abordaje de la misma durante la abstinencia temprana podría resultar un factor clave en el mantenimiento de la abstinencia, así como en el curso del TUA y la depresión.

3. Las diferencias debidas al mecanismo de acción específico del antidepresivo utilizado en cada ensayo: Algunos estudios indicarían que dentro del amplio abanico de antidepresivos utilizados en el TUA, algunos podrían mostrar diferentes índices de eficacia. Así, la integración de diferentes ensayos ha llevado a algunos autores a poner de manifiesto que, a pesar de ser los antidepresivos más utilizados (Agabio et al., 2018), los ISRSs

carecerían de la evidencia empírica suficiente que respaldara su eficacia por encima del placebo (Iovieno et al., 2011; Torrens et al., 2005). Más aún, y quizás explicando su escasa eficacia, algunos ensayos mostrarían que los ISRSs podrían inducir un empeoramiento en el curso de estos pacientes, llevando a presentar aumentos en el consumo de alcohol y una capacidad menor de mantener la abstinencia (Charney et al., 2015; Dundon et al., 2004; Chick et al., 2004; Kranzler et al., 1996; Pettinati, 2000). En relación a estos resultados, algunos autores han reportado casos clínicos que vincularían episodios de intoxicación e incluso la aparición de TUA con el tratamiento con ISRSs (Atigari et al., 2013; Brookwell et al., 2014; Menkes y Herxheimer, 2014). Finalmente, otros autores han sugerido que el uso de nuevos antidepresivos como la mirtazapina, que aumentaría la señalización 5-HT y noradrenérgica mediante la activación de receptores en lugar de bloquear su recaptación, podrían resultar más eficaces que los ISRSs (Cornelius et al., 2016). Otros antidepresivos, como los ATCs, también han mostrado resultados más sólidos que los ISRSs (Iovieno et al., 2011). Esto parece indicar, por un lado, que algunos pacientes comórbidos no solo no se beneficiarían de los ISRSs, sino que, además, el tratamiento podría repercutir gravemente en el deseo por consumir alcohol, generando un marco de vulnerabilidad para la recaída en el TUA, y por otro, aunque la explicación de este efecto es aún desconocida, que el mecanismo de acción enfocado a la inhibición de la recaptación de 5-HT propia de estos fármacos podría estar subyaciendo a este efecto adverso. En conjunto, estos resultados indicarían que un antidepresivo con un mecanismo de acción diferente podría ser el indicado en estos pacientes.

4. Las diferencias debidas al momento en que el tratamiento es administrado: Como hemos visto anteriormente, la abstinencia del TUA es un periodo en el que la sintomatología depresiva es frecuente y, de no ser debidamente abordada, podría repercutir negativamente en el curso del TUA en la medida en que pudiera dirigir la motivación por retomar el consumo de alcohol. En parte debido a esto, es común que la atención médica sea solicitada en este período. Estas serían quizás unas de las principales razones de que la mayoría de los ensayos clínicos implementen el tratamiento en los

pacientes que han atravesado un periodo de desintoxicación y abstinencia. A este respecto, algunos autores han señalado que el tratamiento con ISRSs podría tener una repercusión negativa sobre el consumo de alcohol en el TUA severo, que presentaría una mayor carga sintomática de depresión (Pettinati, 2000; Kranzler et al., 1996), algo que según otros autores han señalado, podría deberse a que estos pacientes no hubieran alcanzado una abstinencia estable al iniciarse el tratamiento, aumentando la frecuencia con que se produjeron los episodios de consumo de alcohol durante el mismo (Charney et al., 2015). Esto parece indicar que, cuando la depresión agrava el TUA, deben contemplarse con cautela tanto la elección del fármaco como la ventana temporal en la que este ejercería su efecto terapéutico en ausencia de repercusiones negativas sobre el consumo de alcohol.

5. El análisis de las variables neurobiológicas que subyacen a los efectos del tratamiento antidepresivo en pacientes comórbidos es limitado, y queda relegado a estudios postmortem o de neuroimagen que presentarían, además de diversas limitaciones metodológicas, una representación escasa en la literatura.

4.4.2 Evidencia preclínica en la comorbilidad TUA-depresión

Los ensayos clínicos muestran hasta la fecha información inconcluyente en relación a la eficacia del tratamiento antidepresivo en el TUA. Esto hace especialmente relevante la información que los estudios preclínicos pueden aportar en esta materia, especialmente a la hora de desarrollar nuevos fármacos y para incidir sobre aspectos de la comorbilidad que suponen importantes limitaciones para los ensayos clínicos (Ng et al., 2017). No obstante, los estudios preclínicos dirigidos a implementar tratamientos farmacológicos antidepresivos en el TUA se han centrado en aspectos ligados al consumo en animales no dependientes del alcohol, dejando de lado los aspectos fundamentales que solo la utilización de modelos animales de TUA permitiría contemplar. Esto supone, además, que muchos de los antidepresivos utilizados en los ensayos clínicos carecerían de la validación preclínica que establecería perfiles de

eficacia y seguridad fiables previa implementación clínica (Barajaz y Kliethermes, 2017). Por tanto, el diseño y desarrollo de nuevos fármacos que pudieran abordar al completo la trayectoria longitudinal el TUA, especialmente en circunstancias de depresión comórbida, supone aún un importante desafío para la investigación (Butelman y Kreek, 2017). Así, entre otras consideraciones, los autores reclaman un mayor número de estudios centrados en las repercusiones del tratamiento sobre el consumo en la recaída (Bell et al., 2017). A este respecto, de entre los paradigmas utilizados, el modelo basado en el efecto de la privación de alcohol (*alcohol deprivation effect*, ADE) en rata sería quizás uno de los más apropiados para evaluar el efecto de un tratamiento farmacológico en la motivación por retomar el consumo de alcohol (Vengeliene et al., 2014). A continuación se indican las principales fuentes de controversia en relación a los resultados de estos estudios y su traslación clínica con los principales puntos mencionados.

En primer lugar, la mayoría de los estudios que han evaluado el tratamiento antidepresivo en animales expuestos a alcohol se han centrado en la evaluación de la conducta de tipo depresivo o en el consumo de alcohol, pero pocos han incidido en ambos aspectos al mismo tiempo. Teniendo en cuenta que los estudios clínicos apuntarían a que la respuesta al tratamiento antidepresivo vendría acompañada por una reducción del consumo de alcohol, es necesario un mayor número de estudios preclínicos que evalúen la eficacia del antidepresivo sobre el curso de ambas patologías (Ng et al., 2017) (punto 1 de evidencia clínica). De hecho, la utilización de modelos animales de TUA y de depresión conjuntamente podría ayudar a esclarecer las diferencias en la respuesta al tratamiento antidepresivo en pacientes con depresión primaria y depresión inducida por el TUA observadas en la población clínica (punto 2 de evidencia clínica).

En segundo lugar cabe destacar el método de tratamiento a la hora de evaluar la eficacia del antidepresivo. Por ejemplo, diferentes antidepresivos han mostrado el potencial de reducir el consumo de alcohol un día después de una sola administración (Simon O'Brien et al., 2011). Pero, por otro lado, los estudios que han extendido el tratamiento, observaban que esta reducción era significativa tras varios días (Daoust et al., 1984), reducciones que, además, según otros autores, no se mantendrían a lo largo de todo el tratamiento (Gulley et al., 1995). Por último, los estudios que ampliaban la

evaluación del consumo a un periodo de post-tratamiento, han encontrado principalmente una recuperación (Skelly y Weiner, 2014) e incluso un incremento en el mismo con respecto al consumo basal (Ho et al., 2016). Estos datos parecen indicar que los cambios en el consumo de alcohol bajo tratamiento podrían estar explicados por una interacción farmacológica entre el alcohol y el antidepresivo, vinculado a su efecto inmediato sobre la señal monoaminérgica, pero no necesariamente ligada a su efecto terapéutico final, que sería observable tras un período prolongado de exposición al fármaco. Además, aun cuando el tratamiento se administrara de forma crónica, su capacidad para reducir el consumo estaría limitada en el tiempo. Aunque esto es algo que, debido a las posibles interacciones que el consumo de alcohol pudiera tener sobre el efecto terapéutico del antidepresivo durante su administración, estaría aún por confirmar.

En tercer lugar, muy pocos estudios administrarían el tratamiento antidepresivo crónico específicamente en ausencia del alcohol para evitar esta posible interacción farmacológica, al contrario de lo predominante en la mayoría de los ensayos. Se ha constatado que, tras un periodo de abstinencia, tanto los ISRSs como los IRSNs, administrados de forma aguda un día antes de la re-exposición al alcohol pueden reducir el consumo en animales dependientes del alcohol (Simon O'Brien et al., 2011). Por el contrario, estudios posteriores de nuestro laboratorio han mostrado que algunos de estos antidepresivos y otros fármacos con mecanismo de acción selectivos, como los ISRSs y los inhibidores selectivos de la recaptación de noradrenalina (ISRNs) producirían un aumento sostenido en el tiempo sobre los niveles de consumo de alcohol en animales tratados a lo largo de un periodo de abstinencia y re-expuestos al alcohol al finalizar el tratamiento crónico (Alén et al., 2013; 2014). Estos datos indican que los antidepresivos tendrían efectos opuestos en función de la cronicidad de su administración sobre la recuperación del consumo de alcohol. Además, estos resultados convergerían con los datos clínicos que indicarían que, dados sus efectos sobre el consumo, un mecanismo de acción selectivo podría ser una opción contraproducente de tratamiento, especialmente cuando se administra durante la abstinencia (puntos 3 y 4 de evidencia clínica).

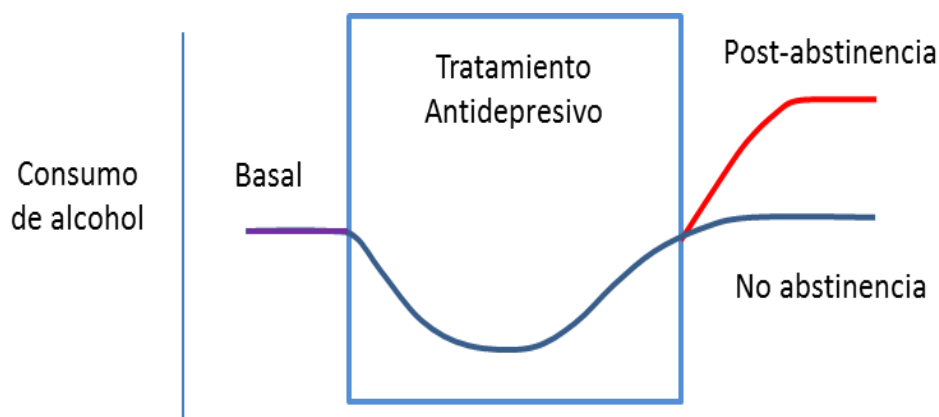


Figura 13. Representación gráfica de la síntesis de los estudios preclínicos que evalúan el consumo de alcohol a consecuencia del tratamiento con antidepresivos. Contemplando los datos disponibles, el antidepresivo administrado durante la exposición al alcohol reduciría temporalmente el consumo y el cese del tratamiento se correspondería con una recuperación de los niveles iniciales del mismo (azul), mientras que la administración del tratamiento durante una etapa de abstinencia podría resultar en un incremento en los niveles de consumo en la recaída (rojo).

Teniendo en cuenta que el consumo voluntario de alcohol en animales puede estar ligado a los diferentes sistemas de transmisión que se verían alterados por antidepresivos con mecanismos de acción específicos (Daoust et al., 1984), los estudios en modelos animales de TUA deben contemplar los efectos que diferentes mecanismos de acción tendrían sobre el consumo, especialmente en una etapa posterior al tratamiento crónico. Este aspecto resultaría crucial a la hora de implementar el antidepresivo con el mecanismo de acción óptimo, que contribuya a mantener una reducción en el consumo de alcohol tras su administración. Finalmente, permitiría detectar aquellos antidepresivos cuyo mecanismo de acción pudiera estar explicando los resultados negativos que muestran los ensayos clínicos (punto 3 de evidencia clínica).

Por último, cabe señalar que los estudios preclínicos constituyen la principal fuente de información relativa a las variables neurobiológicas que subyacen a la comorbilidad y al efecto terapéutico del tratamiento farmacológico (Paterson y Markou, 2007; Renoir et al., 2012) y para poder obtener la información de estas variables que pudiera ser trasladada a las condiciones que se observan en la población clínica, estas deberían ser analizadas en estudios que traten de adecuar su diseño experimental a estas condiciones (Bell et al., 2017). Además, teniendo en cuenta que la modulación de la señalización monoaminérgica no sería la variable última del efecto terapéutico del antidepresivo, deben contemplarse otros factores neurobiológicos

especialmente relacionados con la fisiopatología del TUA, que al mismo tiempo serían relevantes para la evolución del mismo. En relación a este último punto, este manuscrito trata de incidir sobre algunos de los principales mecanismos que modularían los efectos que diferentes tratamientos antidepresivos podrían ejercer sobre el consumo de alcohol (punto 5 de evidencia clínica).

En este punto, teniendo en cuenta la relevancia de la depresión en el curso del TUA, resulta especialmente necesario abordar la sintomatología depresiva, al ser esta intervención un elemento fundamental a la hora de mantener la abstinencia en los pacientes. Pero, atendiendo a algunos resultados, también es necesario proceder con cautela a la hora de elegir e implementar el antidepresivo adecuado. Para poder tener una comprensión más amplia acerca de esta cuestión, los estudios en modelos animales de TUA, cuyo diseño trate de reflejar las condiciones de los pacientes, resultan una herramienta fundamental que, además, nos permitiría incidir en las variables causales que subyacen a la complejidad de esta interacción patológica, así como de los mecanismos biológicos que podrían ser potenciales dianas terapéuticas en la comorbilidad del TUA y la depresión.

5. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

El tratamiento con antidepresivos es frecuente entre pacientes con diagnóstico de TUA. Estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio en modelos preclínicos muestran que algunos antidepresivos tendrían repercusiones negativas sobre el consumo de alcohol en la recaída. De esta forma, nos encontramos frente a la necesidad de comprobar la eficacia de posibles tratamientos que no tengan un impacto negativo sobre el consumo y que puedan resultar más seguros en los pacientes con TUA. Por otro lado, los mecanismos neurobiológicos implicados en este proceso son muy limitados. En esta Tesis Doctoral nos propusimos los siguientes objetivos:

OBJETIVOS GENERALES

1. Estudiar los efectos del tratamiento subcrónico (14 días) con antidepresivos de distintos mecanismos de acción (ISRS, ISRN y IRND), administrados en un período de abstinencia, sobre la recaída en el consumo de alcohol en un modelo animal de auto-administración basado en el efecto de privación de alcohol (*alcohol deprivation effect*, ADE).
2. Estudiar las posibles alteraciones que el tratamiento con antidepresivos pudiera tener sobre el sEC y el sistema glutamatérgico en estructuras cerebrales vulnerables, siendo dos de los sistemas que pueden estar relacionadas con la conducta de auto-administración de alcohol en la recaída.
3. Realizar una revisión sobre la evidencia clínica y preclínica disponible en relación a la eficacia del tratamiento antidepresivo en el TUA, analizando la implicación de la neurogénesis hipocampal como un mecanismo potencialmente relevante en los efectos que el tratamiento antidepresivo tendría sobre el consumo de alcohol, con el fin de establecer nuevas hipótesis para futuros trabajos de investigación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudiar los efectos del tratamiento con bupropion (IRDN) administrado de forma subcrónica durante la abstinencia, sobre la conducta de auto-administración de alcohol en ratas sometidas a ADE durante un período de 3 semanas de recaída en comparación con los efectos conocidos de la fluoxetina (ISRS).
2. Analizar los efectos del tratamiento con bupropion (IRDN) y fluoxetina (ISRS) sobre los niveles de ARN mensajero y la densidad de proteína y de componentes relacionados con los principales receptores y enzimas del sistema glutamatérgico en la CPF de los animales.
3. Analizar los efectos del tratamiento con bupropion (IRDN) y fluoxetina (ISRS) sobre los niveles de ARN mensajero y la densidad de proteína y de componentes relacionados con los principales receptores y enzimas del sEC en la CPF de los animales.
4. Analizar los efectos del tratamiento con reboxetina (ISRN) administrado de forma subcrónica durante la abstinencia, sobre la conducta de auto-administración de alcohol en ratas sometidas a ADE y durante un período de 3 semanas de recaída.
5. Analizar los efectos del tratamiento con reboxetina (ISRN) sobre los niveles de ARN mensajero y la densidad de proteína y de componentes relacionados con los principales receptores y enzimas del sistema glutamatérgico en la CPF y el HPC dorsal de los animales.
6. Analizar los efectos del tratamiento con reboxetina (ISRN) sobre los niveles de ARN mensajero y la densidad de proteína y de componentes relacionados con los principales receptores y enzimas del sEC en la CPF y el HPC dorsal de los animales.
7. Desde una perspectiva teórica, integrar el fenómeno de la neurogénesis en los procesos de recaída en el consumo de alcohol y su posible participación en la acción del tratamiento antidepresivo.

La consecución de los objetivos mencionados nos permitirá contrastar las siguientes hipótesis.

HIPÓTESIS

1. El tratamiento con antidepresivos durante la abstinencia alcohólica puede alterar la auto-administración de alcohol en la recaída en función de su mecanismo de acción.

2. El tratamiento con antidepresivos durante la abstinencia alcohólica tiene una repercusión sobre el sistema glutamatérgico y el sEC en estructuras encefálicas especialmente vinculadas a la recaída en el consumo de alcohol como la PFC y el HP, que puede variar en función de su mecanismo de acción sobre monoaminas.

3. Además de la excitación glutamatérgica, otros fenómenos de plasticidad como la neurogénesis hipocampal podrían estar implicados en la recaída en el consumo de alcohol y podrían verse afectados por un tratamiento farmacológico con antidepresivos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Diseño y procedimiento

El paradigma de auto-administración operante de alcohol es una de las herramientas más frecuentemente utilizadas para la realización de modelos animales de TUA y resulta especialmente útil a la hora de estudiar el componente motivacional por consumir alcohol, descrito como un aumento en la probabilidad de que se repita una conducta asociada a la señal reforzante de la sustancia. En conjunto con el paradigma de auto-administración, en este trabajo se ha utilizado un modelo de recaída en el consumo basado en el ADE, que busca modelizar la progresión en el hábito del consumo de alcohol, manifestado en forma de un aumento en el mismo tras un período de abstinencia. En el intervalo de la abstinencia donde se implementó un tratamiento subcrónico con antidepresivos, y los animales fueron re-expuestos a al auto-administración de alcohol 24h después de dicho tratamiento. Una hora después de la finalización la última sesión de la auto-administración durante la recaída, se procedió a la extracción de muestras biológicas (CPF e HPC dorsal) para su posterior análisis.

El diseño completo incorpora una serie de elementos que dotan a la investigación de validez predictiva y aparente en relación al estudio de los efectos que el tratamiento farmacológico tendrían sobre la recaída en el consumo de alcohol (Bell et al., 2017; June y Gilpin, 2010; Vengeliene et al., 2014).

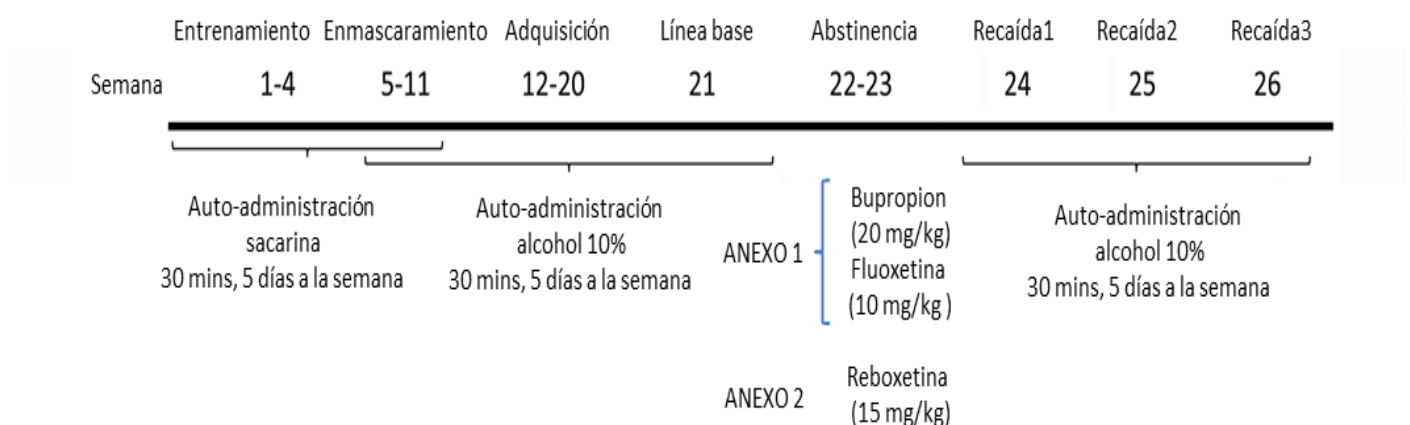


Figura 24. Representación esquemática del diseño experimental empleado en los dos trabajos recogidos en anexos 1 y 2. Una hora después de la última sesión de auto-administración, se procedió a la extracción de muestras de CPF (ANEXO1) y CPF e HPC dorsal (ANEXO2) para el análisis posterior de ARNm y densidad de proteína de los sistemas EC y glutamatérgico.

6.2 Animales de experimentación

Para la realización de los experimentos se emplearon ratas Wistar macho de edad adulta (ENVIGO, Barcelona, España) con peso inicial de 375-425g. Estos animales serían, según la literatura disponible, la especie idónea para alcanzar los objetivos de este trabajo (Vengeliene et al. 2014). A su llegada a las instalaciones, los animales fueron alojados en grupos (n=3-4) en jaulas de metacrilato transparente provistas de rejilla metálica en una habitación a temperatura y humedad constantes (23 ± 1 °C) con un ciclo de luz / oscuridad de 12 h (luces apagadas a las 12:00 p.m.). Los animales tuvieron acceso *ad-libitum* a pienso estándar (marca) y agua corriente. Previo inicio del estudio, los animales permanecieron en estas condiciones durante un período de habituación de 2 semanas desde su llegada a las instalaciones. Finalizado el período de habituación, fueron distribuidos individualmente en jaulas de metacrilato. Desde entonces, los animales permanecieron en esta condición hasta la finalización del estudio. Las condiciones de aislamiento prolongado están relacionadas con la aparición de conductas de tipo depresivo en roedores, así como por alteraciones en procesos de neuroplasticidad en el HPC y la CPF (Ieraci et al., 2016).

Todos los procedimientos experimentales con animales se realizaron de conformidad con la Directiva Europea 2010/63 / UE sobre la protección de los animales utilizados con fines científicos y con la normativa española (RD 53/2013 y 178/2004). Todos los protocolos fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad Complutense de Madrid (PROEX: 077/16, título: "Impacto del uso de antidepresivos sobre el consumo de alcohol y cocaína: Efectos indeseados y mecanismos"). Se tuvo especial cuidado en minimizar el sufrimiento y el número de animales para lograr nuestros objetivos de investigación.

6.3 Auto-administración operante de alcohol

Para la evaluación del consumo se emplearon cajas de auto-administración operantes (Letica, modelo LE 850; Panlab, Barcelona, España). Estas cajas están equipadas con dos palancas retráctiles (una es la palanca activa y la otra la palanca inactiva), ubicadas a cada lado del receptáculo en el que los refuerzos se ponían a disposición del animal.

Durante todo el estudio, el procedimiento operante obedecía a un programa de razón fija 1. Al presionar la palanca activa, se producía la liberación de 0,1 mL de la solución (refuerzo) correspondiente a cada fase del estudio en el receptáculo. Esta solución estaba disponible durante 2,5 segundos, durante este tiempo, el cual el presionado de la palanca activa no tenía ninguna consecuencia. Todas las sesiones de auto-administración duraron 30 minutos y se realizaron diariamente, durante 5 días a la semana (de lunes a viernes) a lo largo de todo el estudio, con una interrupción de 14 días en la que se administraron los tratamientos (periodo de abstinencia). El número de veces que los animales presionaron tanto la palanca activa como la inactiva se registró automáticamente mediante un software informático. Concretamente, el estudio comenzó con una fase de entrenamiento y adquisición de la conducta de auto-administración operante. El entrenamiento se llevó a cabo utilizando el programa anteriormente descrito empleando una solución de sacarina 0,2% (Sigma-Aldrich, España).

Una vez alcanzada una conducta estable, se implementó un protocolo de enmascaramiento de alcohol con el objetivo de sustituir la solución de sacarina por una solución final de alcohol 10%, que consiste en una modificación del procedimiento tradicional de desvanecimiento de sacarina (Samson et al. 1999). Durante este proceso, la concentración de sacarina de la dilución fue reduciéndose en pos de una creciente concentración de etanol a lo largo de la consecución de sesiones como se describe a continuación;

- Sacarina 0,2%: 3 sesiones
- Sacarina 0,16% y alcohol 2%: 3 sesiones
- Sacarina 0,12% y alcohol 4%: 3 sesiones
- Sacarina 0,08% y alcohol 6% : 4 sesiones

- Sacarina 0,04% y alcohol 8%: 4 sesiones
- Sacarina 0,02% y alcohol 10%: 4 sesiones
- Alcohol 10% durante el resto de la investigación

La solución de alcohol en las diferentes concentraciones (2, 4, 6, 8 y 10% de etanol p / v de solución) empleadas en los sesiones de auto-administración se prepararon diariamente a partir de alcohol etílico (99%) (Alcoholes Aroca, España).

Los niveles de consumo se analizaron obteniendo los valores de ingesta de alcohol en relación al peso de los animales utilizando para ello los siguientes cálculos;

$$\text{consumo de alcohol } \left(\frac{g}{kg}\right) = \frac{\text{volumen de alcohol consumido (mL)} * \text{concentración de alcohol } \left(\% \frac{v}{v}\right) * \text{densidad del alcohol a temperatura ambiente } \left(\frac{g}{mL}\right)}{\text{peso de animal (kg)}}$$

Siendo:

*Volumen de alcohol consumido (mL) = número de refuerzos * volumen fijo (0,1 mL)*

Densidad de alcohol a temperatura ambiente = 0,789 g/mL

Concentración de alcohol = 10% v/v

6.4 Tratamiento farmacológico antidepresivo

Para la realización de los estudios, se emplearon diferentes fármacos antidepresivos. El Bupropion clorhidrato se adquirió en Sandoz (España). La fluoxetina clorhidrato se obtuvo de Eli Lilly (España). La reboxetina clorhidrato se obtuvo de Tocris Bioscience (USA). Las soluciones de bupropion, fluoxetina y reboxetina se prepararon diariamente disolviendo en solución salina al 0,9%, y se administraron por vía intraperitoneal (i.p.) a una dosis de 20 mg/kg (bupropion), 10 mg/kg (fluoxetina) y 15 mg/kg (reboxetina) en un volumen de 2 ml / kg, una vez al día durante los 14 días de la abstinencia de alcohol. La elección de los antidepresivos utilizados pretende abarcar los mecanismos de acción dirigidos a las 3 principales monoaminas (5-HT, noradrenalina y dopamina). Las dosis de bupropion y reboxetina se eligieron por su potencial en la prevención de la recaída en el consumo de nicotina (Budzyńska y Biała,

2011; Rauhut et al., 2002), con el objetivo de compararlas con dosis de fluoxetina que, según nuestros resultados previos (Alén et al., 2013), producía un aumento en la recaída en el consumo de alcohol.

6.5 Obtención de muestras biológicas

Una hora después de la última sesión de auto-administración de la tercera semana de recaída, se procedió a practicar la eutanasia a los animales por decapitación. Se llevó a cabo la extracción del encéfalo utilizando el instrumental quirúrgico apropiado, y se almacenó el encéfalo a una temperatura de -80°C para su disección. Posteriormente, mediante el uso de instrumental quirúrgico de precisión y una matriz de disección de encéfalo de rata (Zivic Instruments, Pittsburgh, PA, USA), se realizaron secciones de 2 mm de ancho de los encéfalos previamente almacenados. De esta forma, se obtuvieron las muestras de la CPF (sección desde 4,70 mm a 2,20 mm del bregma) y el HPC dorsal (sección desde -2,30 mm a -4,80 mm del bregma) (Paxinos y Watson 2007). Finalmente, las muestras recogidas fueron almacenadas a una temperatura de -80°C para su posterior análisis de ARNm y densidad de proteína.

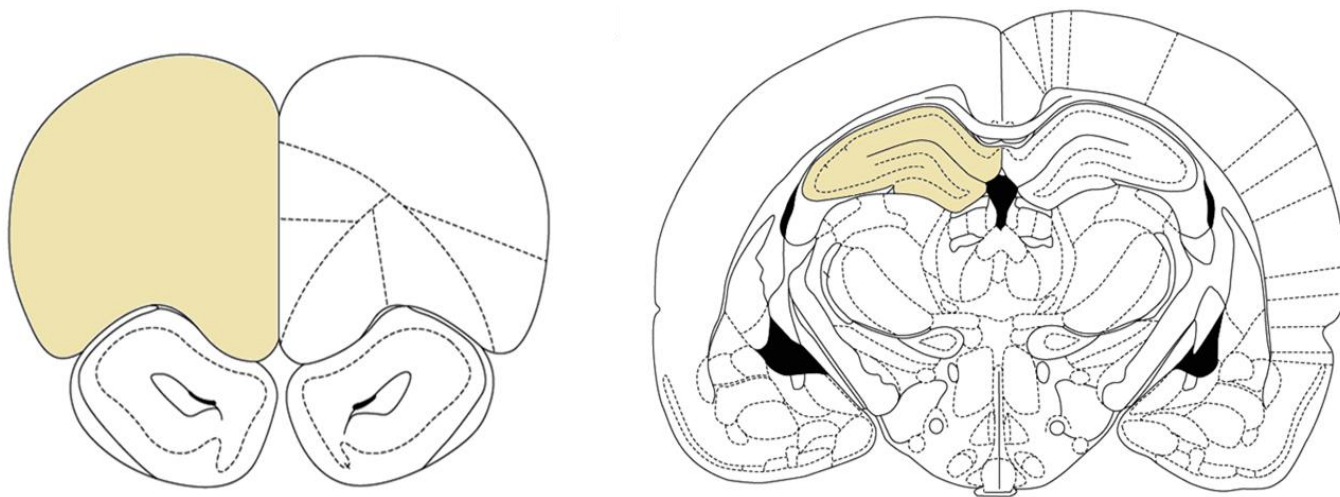


Figura 25. Representación esquemática de las muestras (resaltadas) de CPF (izquierda) e HPC dorsal (derecha) utilizadas en los análisis de ARNm y densidad de proteína. Modificados de Paxinos y Watson, 2007.

6.6 Análisis de expresión génica

En este trabajo se analizaron los niveles de ARNm de los siguientes genes: *Actb* (β -actina); *Cnr1* (CB1); *Cnr2* (CB2); *Ppara* (PPAR α); *Ppar γ* (PPAR γ); *Nape-pld* (NAPE-PLD); *Faah* (FAAH); *Dagla* y *Dagl β* (DAGL α/β); *Mgll* (MAGL); *Gls1* (KGA); *Gls2* (LGA); *Grin1*, *Grin2a*, *Grin2b* y *Grin2c* (subunidades NR1/2A/2B/2C de NMDA); *Gria1*, *Gria2*, *Gria3* y *Gria4* (subunidades GluA1/2/3/4 de AMPA); *Grm3* y *Grm5* (mGlu3/5); *Slc1a1* (EAAC1). El análisis de expresión génica o niveles relativos de ARNm de las muestras obtenidas se llevó a cabo siguiendo los pasos descritos a continuación:

La extracción del ARNm de las muestras homogeneizadas de CPF e HPC de los animales se realizó mediante el método Trizol (ThermoFisher Scientific) con el objetivo de aislar y mantener la integridad de las moléculas de ARNm de las muestras, y el aislamiento del ARN se llevó a cabo mediante el kit ARNeasy MinElute (Qiagen, Hilden, Alemania), según el protocolo validados y descritos previamente (Serrano et al., 2012).

Una vez extraído, se procedió a la cuantificación del ARNm mediante espectrofotometría. Teniendo en cuenta que los ácidos nucleicos (ADN y ARN) absorben la luz a 260 nm y que las proteínas y otros contaminantes lo hacen a 280 y 230nm respectivamente, se midieron las absorbancias para 260, 280 y 230 nm para poder calcular los ratios 260/280 y 260/230 como indicadores del nivel de pureza y contaminación de las muestras. Se consideraron valores aceptables los obtenidos entre 1,8 y 2 para el ratio 260/230 y los valores entre 2 y 2,2 para el ratio 269/230 para cada una de las muestras cuantificadas.

Posteriormente se realizó el ensayo de la reacción en cadena de la polimerasa, que requiere de hebras de ADN para su ejecución, razón por la cual se procedió a obtener el ADN complementario (ADNc) de 1 μ g de la muestra de ARN mediante el ensayo de transcripción inversa.

El ensayo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa en tiempo real se llevó a cabo empleando el sistema de detección de la PCR CFX96TM (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Este sistema permite repetir ciclos (entre 35 y 40) compuestos por tres fases con temperaturas específicas en los que, progresivamente,

la enzima ADN polimerasa sintetizará las cadenas de ADN de interés. Durante la primera fase del ciclo tiene lugar un proceso de desnaturalización de la cadena de ADN en el que, a una temperatura cercana a los 95°C, las hebras complementarias se separan. La segunda fase, a una temperatura de 60°C, permite el acoplamiento de los cebadores específicos o *primers* a las hebras desnaturalizadas, que delimitan la sección de ADN a amplificar por la ADN polimerasa. Este aspecto es esencial y requiere del diseño de *primers* específicos que garantizan que solo se amplifica el gen que es objeto de estudio. En la tabla 5 se detalla la selección de *primers* utilizados para cada gen específico en este trabajo. Finalmente, a una temperatura entre los 70 y 80°C, se produce la fase de elongación, en la que la ADN polimerasa genera una hebra complementaria a la sección de ADN previamente delimitada por los cebadores.

La particularidad de la PCR a tiempo real nos permite detectar, por medio de la señal emitida por la sonda TaqMan y el tinte FAM (ThermoFisher Scientific) en la fase de elongación, un incremento en la cantidad de hebras generadas en cada ciclo. Así, la cantidad de señal emitida por cada muestra es proporcional a la cantidad de producto sintetizado. A medida que se suceden los ciclos, la señal emitida alcanza una fase umbral que es detectada por el termociclador. El ciclo en el que se alcanza esta fase recibe el nombre de Ct (*threshold time*). Este ciclo es inversamente proporcional a la cantidad de ADNc de la muestra de partida, así a menor Ct, mayor será la cantidad inicial de ADNc y, por tanto, mayor la expresión de un gen determinado.

Finalmente, como medida de control interno de la muestra, al Ct del gen diana se le resta el con el Ct de un gen normalizador, es decir, de un gen de expresión constitutiva que no se ve alterado por la condición experimental. Para el presente trabajo se empleó el control interno de β -actina.

En análisis de los niveles de expresión génica de los diferentes componentes de los sistemas EC y glutamatérgico se realizó mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, que analiza la diferencia de expresión génica entre muestras procedentes de dos grupos, uno control (vehículo) y otro de tratamiento antidepresivo (fluoxetina, bupropion o reboxetina). Esto permite conocer cuántas veces se encuentra aumentada o disminuida la expresión de un gen a consecuencia de un tratamiento con respecto al grupo control (*fold change*) y nos indica una mayor expresión de un gen cuando su valor es superior

a 1, e indicando una disminución cuando es inferior a esta cifra. Por lo tanto, el *fold change* viene determinado por el siguiente cálculo;

Incremento de veces (fold change) = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde:

$\Delta\Delta Ct$ = ΔCt de la muestra tratada – ΔCt de la muestra control, siendo:

ΔCt = Ct del gen diana – Ct del gen usado como control interno, siendo:

Gen diana: Cada uno de los 22 genes de la tabla 5

Gen control interno: *Actb*, el gen que codifica para β -actina

Gene symbol	Assay ID	GenBank accession number	Amplicon length(bp)
<i>Actb</i>	Rn00667869_m1	NM_0311443	91
<i>Cnr1 (CB1)</i>	Rn02758689_s1	NM_012784.4	92
<i>Cnr2 (CB2)</i>	Rn01637601_m1	NM_020543.4	68
<i>Ppara</i>	Rn00566193_m1	NM_013196.1	98
<i>Pparγ</i>	Rn00440945_m1	NM_013124.3	63
<i>Nape-pld</i>	Rn01786262_m1	NM_199381.1	71
<i>Faah</i>	Rn00577086_m1	NM_024132.3	63
<i>Dagla</i>	Rn01454304_m1	NM_001005886.1	67
<i>Daglβ</i>	Rn01453771_m1	NM_001107120.1	98
<i>Mgl1 (MAGL)</i>	Rn00593297_m1	NM_138502.2	78
<i>Gls1 (kidney-type)</i>	Rn00561285_m1	NM_001109968.1	80
<i>Gls2 (liver-type)</i>	Rn00594296_m1	NM_001270786.1	58
<i>Grin1 (GluN1)</i>	Rn01436034_m1	NM_001270602.1	73
<i>Grin2a (GluN2a)</i>	Rn00561341_m1	NM_012573.3	68
<i>Grin2b (GluN2b)</i>	Rn00680474_m1	NM_012574.1	79
<i>Grin2c (GluN2c)</i>	Rn00561359_m1	NM_012575.3	57
<i>Gria1 (GluA1)</i>	Rn00709588_m1	NM_031608.1	85
<i>Gria2 (GluA2)</i>	Rn00568514_m1	NM_001083811.1	122
<i>Gria3 (GluA3)</i>	Rn00583547_m1	NM_001112742.1	74
<i>Gria4 (GluA4)</i>	Rn00568544_m1	NM_001113184.1	76
<i>Grm3 (mglu3)</i>	Rn01755349_m1	NM_001105712.1	71
<i>Grm5 (mGlu5)</i>	Rn005666628_m1	NM_017012.1	112
<i>Slc1a1 (EAAAC1)</i>	Rn00564705_m1	NM_013032.3	92

Tabla 5. Características de los primers utilizados para el ensayo de PCR en tiempo real.

6.7 Análisis de densidad de proteína

En este trabajo se analizó la densidad de proteína de los principales componentes del sEC (CB1, CB2, PPAR α/γ , DAGL α/β , y MAGL) y el sistema glutamatérgico (subunidades N1 y A1 de los receptores NMDA y AMPA y mGluR3) en la CPF y el HPC de los animales. El análisis llevó a cabo siguiendo los pasos descritos a continuación:

Para el homogenizado de muestra, las secciones de CPF e HPC destinados al análisis de densidad proteica fueron sumergidas en cóctel de homogenización formado por tampón HEPES 50 mM (pH 8) y tampón de sucrosa 0.32 M. Los homogenizados resultantes fueron centrifugados a 800g durante 10 minutos a 4°C, y el sobrenadante obtenido fue centrifugado, a su vez, a 40000g durante 30 minutos a 4°C. El pellet resultante fue re-suspendido en tampón HEPES 50 mM (pH 8).

Una vez homogeneizada la muestra, se procedió a la cuantificación de proteína total de la misma. Para ello se siguió el método de Bradford® (Bradford, 1976), basado en la capacidad de las proteínas de unirse a determinados colorantes. En este caso el colorante azul brillante G-250 coomasie en presencia de ácido fosfórico se adhiere a la proteína, tornándose en otro color que puede ir desde marrón claro a azul intenso, cuya máxima absorción se mide a los 570-590 nm y es proporcional a la concentración de proteína en la muestra. Como curva patrón se utilizaron concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina con siete puntos entre 0 y 0,8mg/ml. Para las mediciones se diluyeron las muestras en una proporción 1/80, Se mezclaron 10 μ l de la dilución o estándar con 200 μ l del reactivo de Bradford y se midió la absorbancia mediante espectrofotometría. Una vez se ajustó la concentración de proteína de las muestras (2 μ g/ μ l), estas se mezclaron con igual volumen de tampón de carga (Laemmli® Buffer con 5% de β mercaptoetanol), para obtener una concentración final de 1 μ g/ μ l.

Para la realización del ensayo de western blot se cargaron 40 μ l de cada muestra en los pocillos de un gel de electroforesis de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%. Después de la separación de proteínas en función de su peso molecular mediante el proceso de electroforesis, se procedió a la transferencia de las

mismas a una membrana de nitrocelulosa (BioRad, Hercules, CA, USA) mediante electrotransferencia.

Una vez finalizado un período de bloqueo de una hora con albúmina de suero bovino al 5% en tampón fosfato salino y tween 20 al 1%, las membranas fueron incubadas durante la noche a 4°C con los distintos anticuerpos primarios empleados en la investigación (ver tabla 6). Una vez terminado este proceso, se procedió a lavar de nuevo las membranas para la realización de la incubación con una dilución 1:10000 de anti-mouse IgG (H + L) o el conjugado HPR-anti-rabbit durante una hora a temperatura ambiente.

Las bandas de proteína de interés fueron visualizadas y cuantificadas mediante quimioluminiscencia usando un sistema de imágenes biológicas AutoChemi UVP (LTF Labortechnik, Bodensee, Alemania). La β -actina se cuantificó y se utilizó como control de carga, empleando el anticuerpo primario anti- β -actina 1: 1000 (Sigma-Aldrich, nº de cat. A5316).

Antigen	Immunogen	Manufacturing details	Dilution
CB ¹ (cannabinoid receptor I)	Synthetic peptide corresponding to C terminal aa 461-472 of human CB1(MSVSTDTSAEAL)	Rabbit polyclonal antibody Abcam Cat. no. ab23703	1:200
CB ² (cannabinoid receptor II)	Fusion protein corresponding to aa 1-32 of rat CB2	Rabbit polyclonal antibody Abcam Cat. no. ab3561	1:200
PPAR α (peroxisome proliferator activated receptor α)	Synthetic peptide corresponding to MVDTESPICPLSPLEADD	Rabbit polyclonal antibody Fitzgerald Cat. no. RDI-PPARAabrx	1:500
PPAR γ (peroxisome proliferator activated receptor γ)	Sequence mapping at the C-terminus of human PPAR γ .	Mouse monoclonal antibody Santa Cruz sc-7273	1:200
DAGL α (diacylglycerol lipase α)	Synthetic peptide from C-terminal region of rat DAGL α (CGASPTKQDDLVISAR)	Rabbit polyclonal antibody Developed in our lab	1:100
DAGL β (diacylglycerol lipase β)	Synthetic peptide from internal sequence of rat DAGL β (SSDSPLDSPTKYPTLC)	Rabbit polyclonal antibody Developed in our lab	1:50
MAGL (monoacylglycerol lipase)	Synthetic peptide corresponding to aa 1-14 of human MAGL (MPEESSPRRTPQSI)	Rabbit polyclonal antibody Cayman Cat. no. 100035	1:200
GluN1 (NMDA glutamate receptor subunit NR1)	Fusion protein containing the exon 5 splice variant of human NR1	Mouse monoclonal antibody SIGMA Cat. no. M-207	1:100
GluA1 (AMPA receptor subunit 1)	Synthetic peptide corresponding to aa residues 271-285 of rat AMPAR1 (RTSDSRDHTRVDWKR)	Rabbit polyclonal antibody ThermoFisher Cat. no. PA5-77415	1:200
mGlu5 (metabotropic glutamate receptor isoform 5)	Synthetic peptide corresponding to residues YDRRLAQHKSEIE of mGluR5	Rabbit polyclonal antibody ThermoFisher Cat. no. PA1-24637	1:500

Tabla 6. Características de los anticuerpos primarios utilizados en el análisis de proteína mediante Western blot.

6.8 Revisión bibliográfica

El trabajo de revisión bibliográfica trata de hacer una reflexión profunda acerca del uso del tratamiento antidepresivo en pacientes con TUA, integrando la información disponible de los principales estudios clínicos, así como la evidencia de los estudios realizados en modelos animales. Este trabajo pretende, además, hacer un énfasis especial sobre uno de los mecanismos que habría sido menos estudiado en el contexto del TUA y el consumo de alcohol. De esta forma, la revisión trata de aportar información sobre la posible implicación de la neurogénesis adulta del hipocampo en los efectos que el tratamiento antidepresivo pudiera ejercer sobre el consumo de alcohol, con el fin de proporcionar un marco para la reflexión sobre la práctica clínica y establecer nuevas hipótesis para futuros trabajos de investigación desde el punto de vista preclínico.

Para la realización de la revisión bibliográfica se utilizaron las principales bases de datos de contenido en Biomedicina (Medline) y Psicología (PsycInfo). La búsqueda de estudios se realizó mediante el uso de las siguientes palabras clave:

“Adult hippocampal neurogenesis”; “Alcohol” “Alcohol abstinence”; “Alcohol consumption”; “Alcohol intake”; “Alcohol relapse”; “Alcohol Use Disorder”; “Alcohol withdrawal”; “Animal models”; “Antidepressants”; “Chronic antidepressant treatment” “Depression”; “Depressive-like behavior”; “Ethanol”; “Hippocampus” “Sub-chronic antidepressant treatment” “Neurogenesis”

Además de los operadores para relacionar los términos:

“And”; “Comorbid”; “In”; “Induced”; “On”; “Related”

6.9 Análisis estadístico

Los datos analizados corresponden a las medias \pm el error estándar de la media (SEM) de cada uno de los grupos experimentales ($n = 8$ en el análisis de consumo de alcohol; $n = 6-8$ en el análisis de los niveles de ARNm; $n = 3-6$ en análisis de la densidad de proteína). Los resultados de la auto-administración de alcohol se realizaron mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) con medidas repetidas (tiempo y tratamiento como factores) y una prueba *post hoc* de comparaciones múltiples (Bonferroni) cuando fue apropiado. Con respecto a los niveles de ARNm y proteína, los resultados se analizaron utilizando, por un lado, un ANOVA de una vía (tratamiento) y la prueba *post hoc* de comparaciones múltiples (Bonferroni) cuando fue apropiado para comparaciones de 3 grupos, y por otro lado, por medio de la prueba *t* de Student para muestras no relacionadas para comparaciones de dos grupos. El análisis estadístico de todos los resultados se realizó mediante el programa informático GraphPad Prism v6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Un valor de p inferior a 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

7. RESULTADOS

7.1 RESULTADOS ESTUDIO 1 (ANEXO 1)

7.1.1 Efectos del tratamiento con bupropion y fluoxetina en el consumo de alcohol durante la recaída

El ANOVA de medidas repetidas indicó un efecto del tratamiento sobre el consumo de alcohol en ratas tratadas con fluoxetina ($F_{1,56} = 21,4$, $p < 0,0001$) después de la recaída durante 3 semanas. No se encontró ningún efecto del tratamiento sobre el consumo de alcohol los animales tratados con bupropion. El análisis de la interacción entre el tiempo y el tratamiento también se observó en animales tratados con fluoxetina ($F_{3,56} = 3,56$, $p < 0,05$), lo que indica que el tratamiento con fluoxetina afectó de manera diferente al consumo de alcohol a lo largo del período de recaída. El análisis *post hoc* mostró un aumento en el promedio semanal del consumo de alcohol en animales tratados con fluoxetina en la primera (* $p < 0,05$), la segunda (** $p < 0,01$) y la tercera semana (** $p < 0,01$) de recaída en comparación con los tratados con vehículo. No se encontraron estos cambios en consumo en el grupo de bupropion ($p > 0,05$, NS). No se encontraron diferencias en el número de veces que los animales presionaron la palanca inactiva en comparación con los diferentes grupos ($p > 0,05$, NS) (Figura 26).

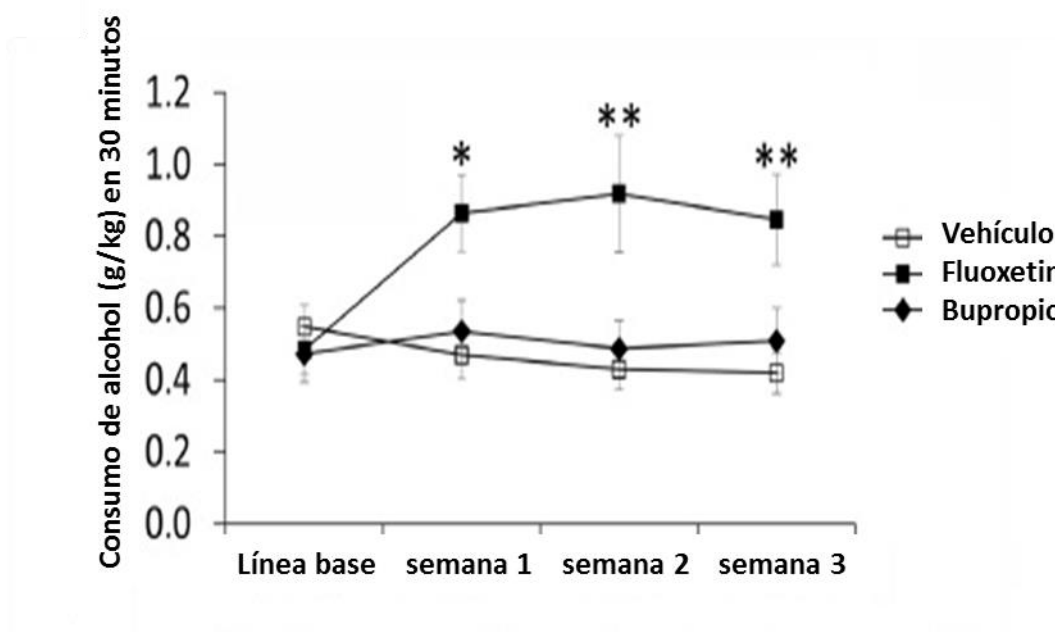


Figura 26. Efectos del tratamiento con bupropion y fluoxetina en el consumo de alcohol. Los datos representan la media \pm SEM ($n = 8$ por grupo) del promedio de consumo de alcohol (g/kg) durante los 5 días de cada semana de la evaluación. Análisis *Post hoc*: * / ** $p < 0,05$ / $0,01$ vs grupo vehículo.

7.1.2 Efectos del tratamiento con bupropion y fluoxetina en los niveles relativos de ARNm y densidad de proteína de los componentes del sistema glutamatérgico en la corteza prefrontal

El ANOVA de una vía mostró diferencias significativas en los niveles relativos de ARNm de *Grin1* ($F_{2,19} = 6,66$, $p = 0,006$), *Grin2b* ($F_{2,19} = 5,64$, $p = 0,011$) y *Gria2* ($F_{2,19} = 4,30$, $p = 0,028$) en la CPF de los animales expuestos al alcohol y sometidos al tratamiento antidepresivo. El análisis *post hoc* (Bonferroni) indicó que los animales tratados con antidepresivos (bupropion y fluoxetina) mostraron una reducción en los niveles de ARNm de *Grin1* (* / ** $p < 0,05$ / $0,01$) en comparación con el grupo de animales que recibió vehículo. Además, los animales tratados con fluoxetina mostraron una disminución en los niveles de ARNm de *Grin2b* (** $p < 0,01$) y un aumento en los niveles de ARNm de *Gria2* y *Gria3* (* $p < 0,05$) en comparación con el grupo de animales que recibió vehículo. No se encontraron cambios en los niveles de ARNm de *Gls*, *Gls2*, *Grin2a*, *Grin2c*, *Gria1*, *Gria4*, *Grm3*, *Grm5* y *Slc1a1* en la CPF de los animales tratados ($p > 0,05$, NS) (Figura 27).

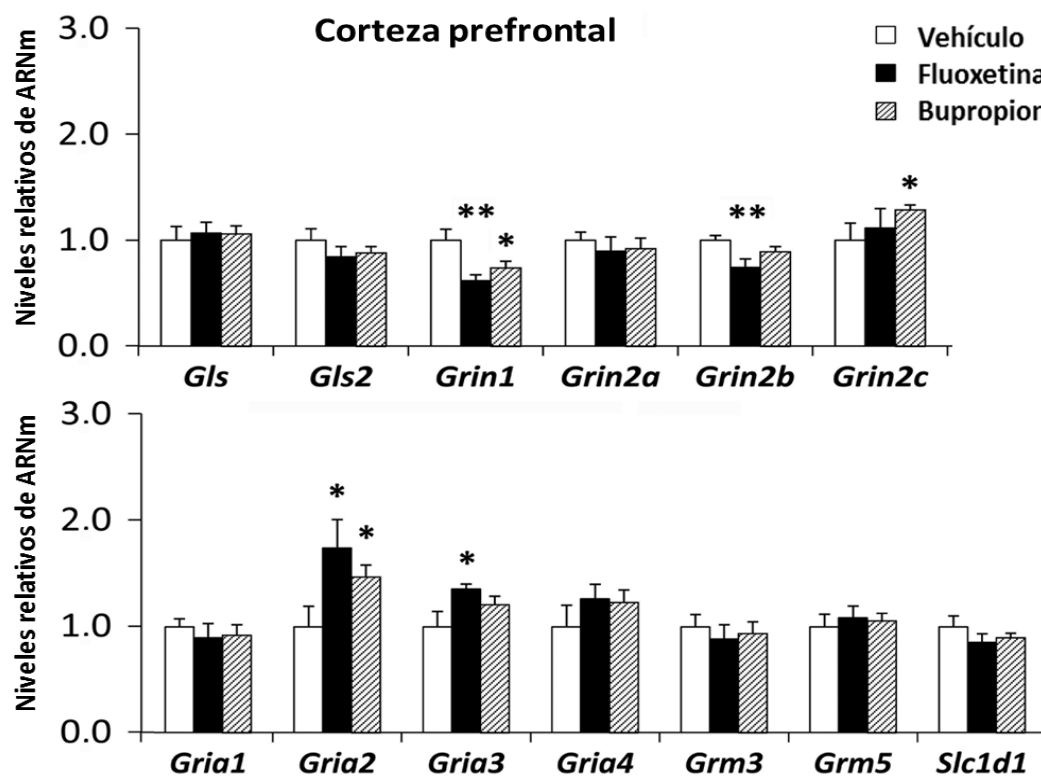


Figura 27. Efectos del tratamiento con bupropion y fluoxetina sobre los niveles relativos de ARNm de los genes vinculados al sistema glutamatérgico en la CPF. Los datos representan la media \pm SEM ($n = 6-8$ por grupo) de la expresión génica relativa obtenida mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Análisis *Post hoc*: * / ** $p < 0,05$ / $0,01$ vs grupo vehículo.

Con respecto a los niveles de densidad de proteína, el ANOVA de una vía indicó diferencias significativas en los niveles de GluN1 ($F_{2,6} = 31,67$, $p = 0,0006$), GluA1 ($F_{2,6} = 35,47$, $p = 0,0005$) y mGlu5 ($F_{2,6} = 7,23$, $p = 0,025$) en la CPF de los animales expuestos al alcohol y sometidos al tratamiento antidepresivo. El análisis *post hoc* (Bonferroni) mostró que los animales tratados con antidepresivos (bupropion y fluoxetina) presentaron menores niveles de proteína de GluN1 y GluA1 en la CPF en comparación con los animales que recibieron vehículo (** / *** $p < 0,01 / 0,001$). Específicamente, los animales tratados con bupropion también mostraron una disminución en los niveles de proteína de mGlu5 (* $p < 0,05$) (Figura 28).

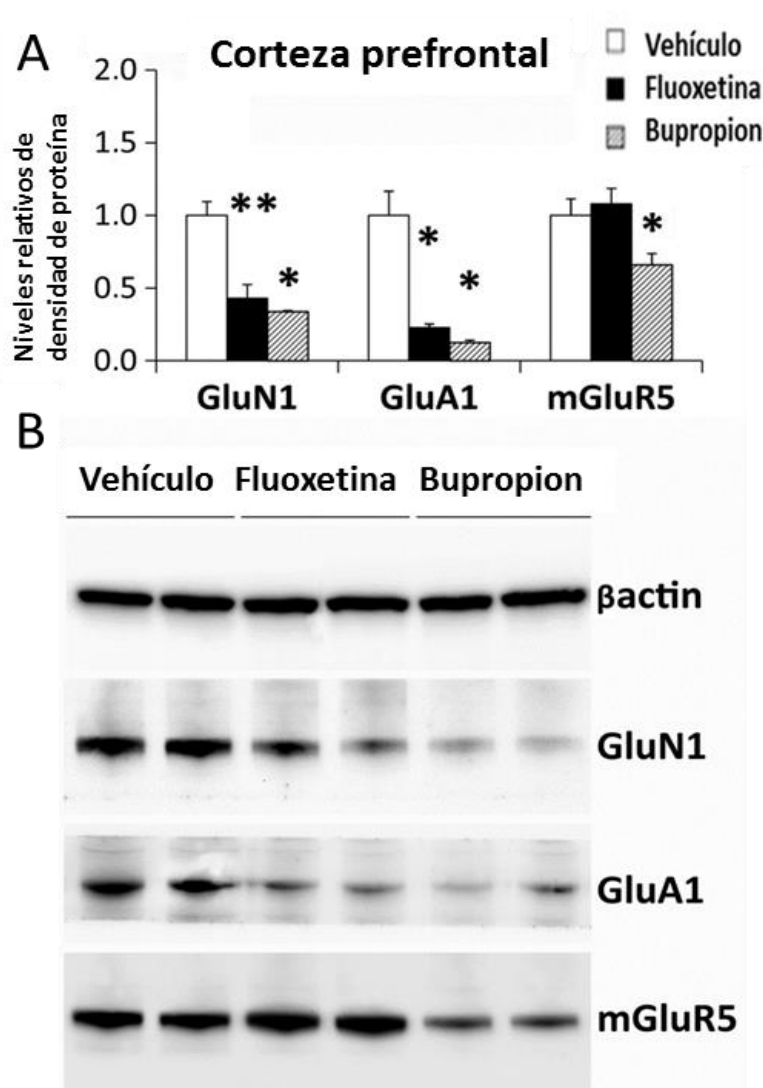


Figura 28. Efecto del tratamiento con bupropion y fluoxetina sobre la densidad de proteína de los componentes del sistema glutamatérgico en la CPF. A: Niveles relativos de densidad de proteína. B: Muestra de las bandas de proteína cuantificadas. Los datos representan la media \pm SEM ($n = 3-6$ por grupo) de la densidad de proteína.

Análisis *Post hoc*: * / ** $p < 0,05 / 0,01$ vs grupo vehículo.

7.1.3 Efectos del tratamiento con bupropion y fluoxetina en los niveles relativos de ARNm y densidad de proteína de los componentes del sEC en la corteza prefrontal

El ANOVA de una vía indicó diferencias significativas en los niveles relativos de ARNm de *Cnr2* ($F_{2,19} = 4,59$, $p = 0,023$), *Ppara* ($F_{2,19} = 3,37$, $p = 0,043$), *Nape-pld* ($F_{2,19} = 5,38$, $p = 0,014$), *Dagla* ($F_{2,19} = 5,99$, $p = 0,009$) y *Daglβ* ($F_{2,19} = 4,34$, $p = 0,027$) en la CPF de los animales expuestos al alcohol y sometidos al tratamiento antidepresivo. El análisis *post hoc* (Bonferroni) indicó que los animales tratados con antidepresivos (bupropion y fluoxetina) mostraron mayores niveles de ARNm de *Nape-pld* (* $p < 0,05$) y una disminución de los niveles de ARNm de *Dagla* y *Daglβ* (* $p < 0,05$) en comparación con los animales que recibieron vehículo. Además, los animales tratados con fluoxetina mostraron un aumento en los niveles de ARNm de *Cnr2* y una disminución en los niveles de ARNm de *Ppara* (* $p < 0,05$). No se encontraron cambios significativos en los niveles de ARNm de *Cnr1*, *Pparγ*, *Faah* y *Mgll* en la CPF de los animales tratados ($p > 0,05$, NS) (Figura 29).

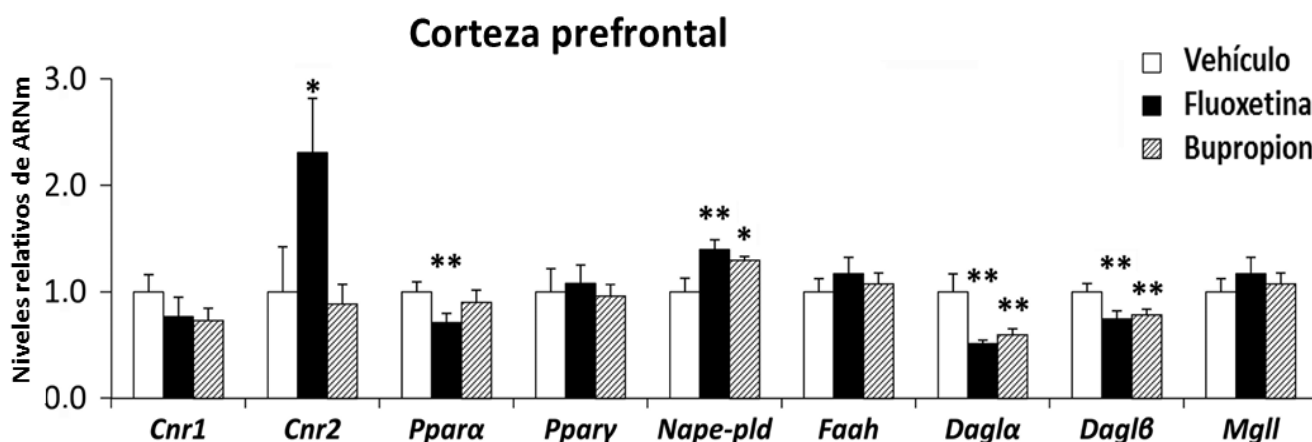


Figura 29. Efectos del tratamiento con bupropion y fluoxetina sobre los niveles relativos de ARNm de los genes vinculados al sEC en la CPF. Los datos representan la media \pm SEM ($n = 6-8$ por grupo) de la expresión génica relativa obtenida mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Análisis *Post hoc*: * / ** $p < 0,05$ / $0,01$ vs grupo vehículo.

Con respecto a los niveles de densidad de proteína, el ANOVA de una vía indicó diferencias significativas en los niveles de proteína de CB1 ($F_{2,6} = 4,58$, $p = 0,033$), CB2 ($F_{2,6} = 12,19$, $p = 0,0005$), PPAR α ($F_{2,6} = 5,47$, $p = 0,020$), DAGL α ($F_{2,6} = 21,01$; $p = 0,001$) y MAGL ($F_{2,6} = 10,04$; $p = 0,0007$) en la CPF de los animales expuestos al alcohol y sometidos al tratamiento antidepresivo. El análisis *post hoc* (Bonferroni)

indicó que los animales que recibieron tratamiento con bupropion mostraron niveles inferiores de proteína de CB1, PPAR α , DAGL α y MAGL en comparación con los animales que recibieron vehículo (* / ** / *** $p < 0,05$ / $0,01$ / $0,001$). Además, los animales que recibieron fluoxetina mostraron un aumento en los niveles de proteína de CB2 y una disminución de DAGL α en comparación con los animales que recibieron vehículo (* / ** $p < 0,05$ / $0,01$) (Figura 30).

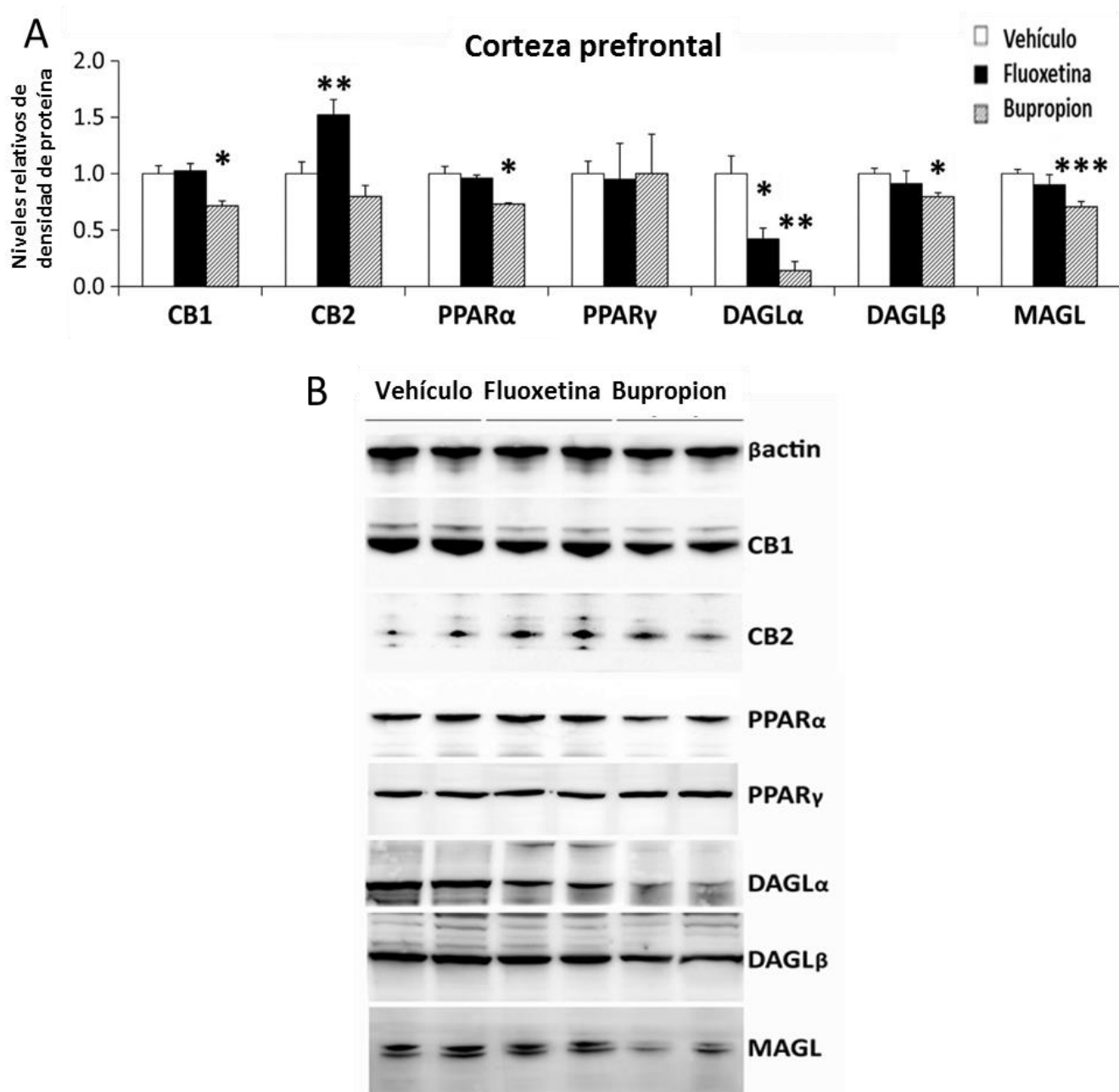


Figura 30. Efecto del tratamiento con bupropion y fluoxetina sobre la densidad de proteína de los componentes del sEC en la CPF. A: Niveles relativos de densidad de proteína. B: Muestra de las bandas de proteína cuantificadas. Los datos representan la media \pm SEM ($n = 6$ por grupo) de la densidad de proteína. Análisis *Post hoc*: * / ** / *** $p < 0,05$ / $0,01$ / $0,001$ vs grupo vehículo.

7.2 RESULTADOS ESTUDIO 2 (ANEXO 2)

7.2.1 Efectos del tratamiento con reboxetina en el consumo de alcohol durante la recaída

El ANOVA de medidas repetidas indicó un efecto de escalada sobre el consumo de alcohol en los animales que recibieron tratamiento con reboxetina, así, los datos relativos a la primera semana, aunque significativos ($F_{1,70} = 12,29$, $p < 0,0003$), fueron menos intensos que los observados en la segunda (efecto del tratamiento $F_{1,70} = 21,72$, $p < 0,0001$), y la tercera semana de recaída ($F_{1,70} = 34,12$, $p < 0,0001$). El análisis también reveló un efecto de la interacción entre el tiempo y el tratamiento en animales tratados con reboxetina ($F_{3,56} = 5,92$, $p = 0,014$), indicando un aumento progresivo en el consumo a consecuencia del tratamiento ($F_{1,56} = 49,76$, $p < 0,0001$), algo que no se observó en animales tratados con vehículo. No se encontraron cambios en la línea base de consumo de alcohol en los animales ($p > 0,05$, NS). No se encontraron diferencias en el número de veces que los animales presionaron la palanca inactiva en comparación con los diferentes grupos ($p > 0,05$, NS) (Figura 31).

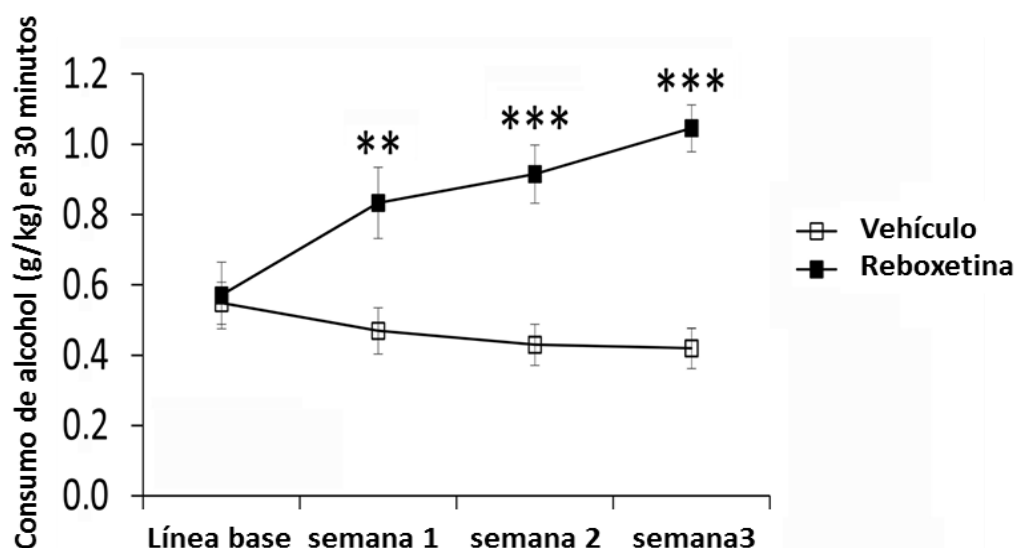


Figura 31. Efectos del tratamiento con reboxetina sobre el consumo de alcohol durante la recaída. Los datos representan la media \pm SEM ($n = 8$ por grupo) del promedio de consumo de alcohol (g/kg) durante los 5 días de cada semana. Análisis *Post hoc*: ** / *** $p < 0,001$ / $0,0001$ vs grupo vehículo.

7.2.2 Efectos del tratamiento con reboxetina en los niveles relativos de ARNm y densidad de proteína de los componentes del sistema glutamatérgico en la corteza prefrontal y el hipocampo dorsal

La prueba t de Student de muestras no relacionadas indicó que los animales que recibieron tratamiento con reboxetina presentaron una disminución en los niveles relativos de ARNm de *Gls1* ($t_{14} = 2,37$, $p = 0,032$) y *GluN2a* ($t_{14} = 2,56$, $p = 0,022$) en la CPF en comparación con los animales que recibieron vehículo. No se encontraron cambios en los niveles de ARNm de *Gls2*, *GluN1*, *GluN2b*, *GluN2c*, *GluA1*, *GluA2*, *GluA3*, *GluA4*, *mGlu3*, *mGlu5* y *Slc1a1* en la CPF de los animales ($p > 0,05$, NS) (Figura 32).

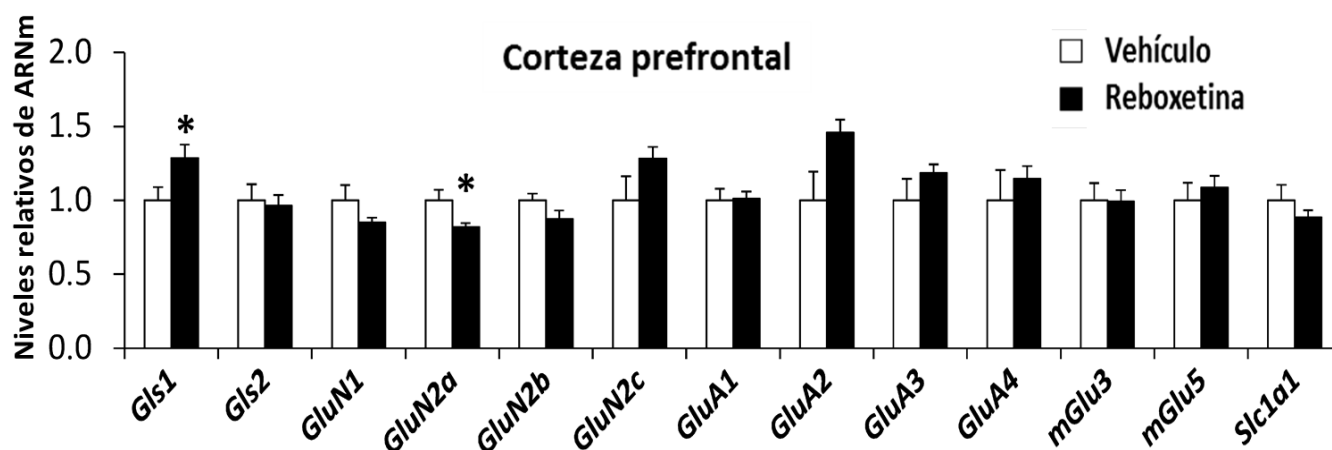


Figura 32. Efectos del tratamiento con reboxetina sobre los niveles relativos de ARNm de los genes vinculados al sistema glutamatérgico en la CPF. Los datos representan la media \pm SEM ($n = 6-8$ por grupo) de la expresión génica relativa obtenida mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Análisis *Post hoc*: * $p < 0,05$ vs grupo vehículo.

Con respecto a los niveles de densidad de proteína, la prueba t de Student de muestras no relacionadas indicó que los animales que recibieron tratamiento con reboxetina mostraron niveles de proteína reducidos de *GluN1* ($t_4 = 7,36$, $p = 0,0018$) y *mGlu5* ($t_4 = 3,50$, $p = 0,024$) en la CPF en comparación con los animales que recibieron vehículo (Figura 33).

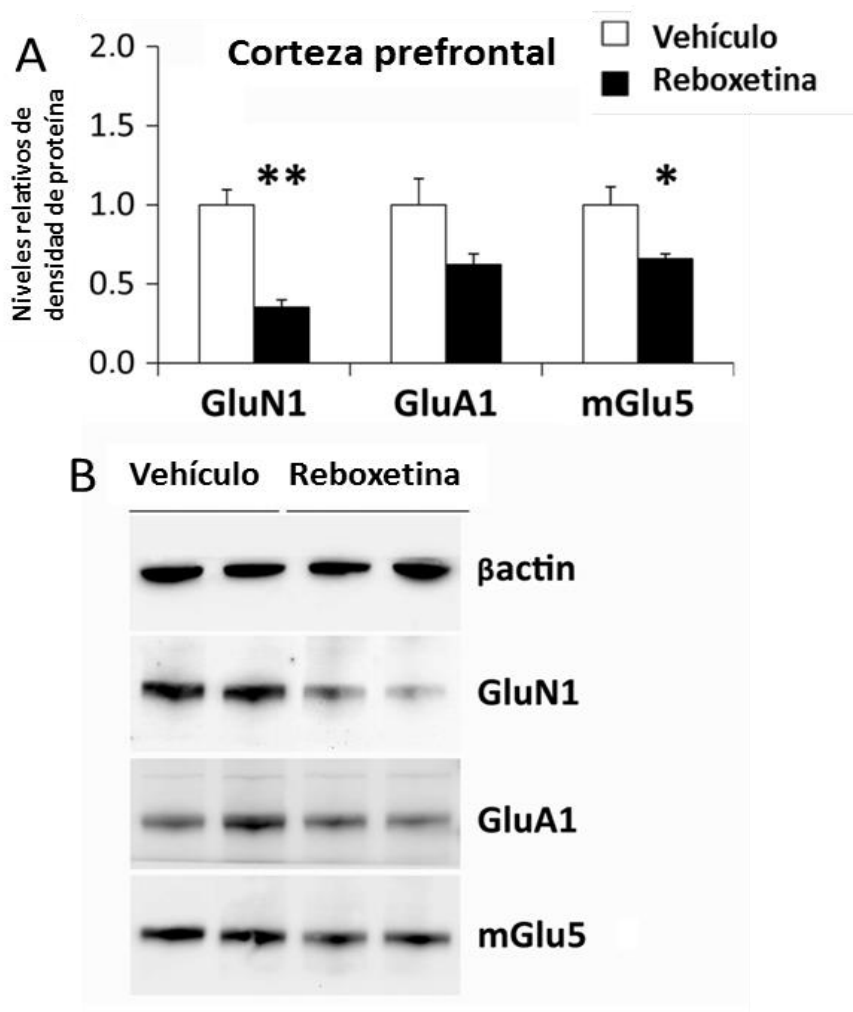


Figura 33. Efecto del tratamiento con reboxetina sobre la densidad de proteína de los componentes del sistema glutamatérgico en la CPF. A: Niveles relativos de densidad de proteína. B: Muestra de las bandas de proteína cuantificadas. Los datos representan la media \pm SEM ($n = 3-6$ por grupo) de la densidad de proteína. Análisis *Post hoc*: * / ** $p < 0,05$ / $0,01$ vs grupo vehículo.

La prueba *t* de Student de muestras no relacionadas indicó que los animales que recibieron tratamiento con reboxetina presentaron una disminución de los niveles de ARNm de *GluN1* ($t_{12} = 2,68$, $p = 0,019$) y *GluN2b* ($t_{12} = 2,22$, $p = 0,045$) y aumentó los niveles de ARNm de *GluA2* ($t_{12} = 3,25$, $p = 0,006$) y *mGlu3* ($t_{12} = 2,41$, $p = 0,032$) en el HPC dorsal en comparación con los animales que recibieron vehículo. No se encontraron cambios en los niveles de ARNm de *Gls1*, *Gls2*, *GluN2a*, *GluN2c*, *GluA1*, *GluA3*, *GluA4*, *mGlu5* y *Slc1a1* en el HPC dorsal de los animales tratados con Reboxetina en comparación con los que recibieron vehículo ($p > 0,05$, NS) (Figura 34).

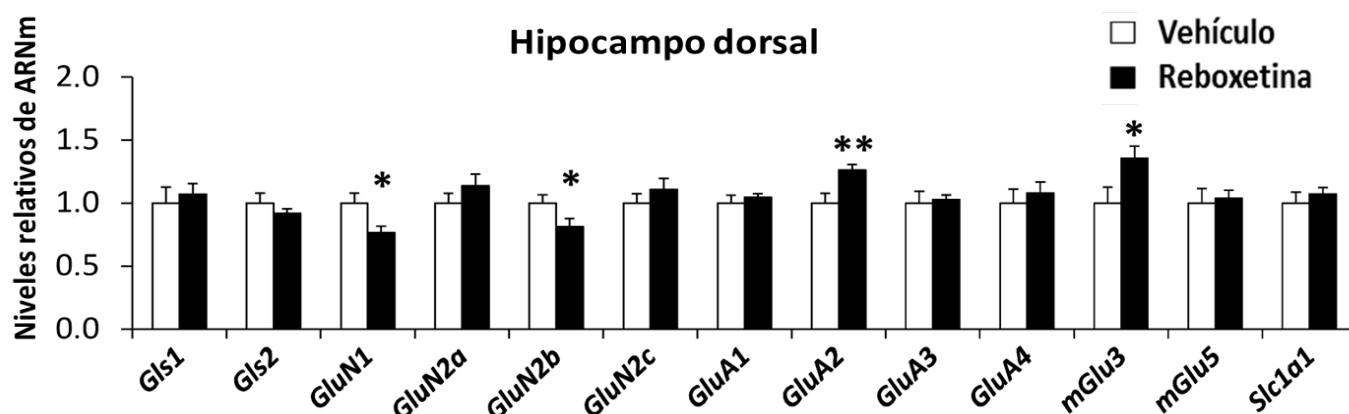


Figura 34. Efectos del tratamiento con reboxetina sobre los niveles relativos de ARNm de los genes vinculados al sistema glutamatérgico en el HPC dorsal. Los datos representan la media \pm SEM ($n = 6-8$ por grupo) de la expresión génica relativa obtenida mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Análisis Post hoc: * / ** $p < 0,05 / 0,01$ vs grupo vehículo.

Con respecto a los niveles de densidad de proteína, la prueba t de Student de muestras no relacionadas indicó que los animales que recibieron tratamiento con reboxetina mostraron una disminución en los niveles de proteína de GluN1 ($t_4 = 2,68$, $p = 0,05$), GluA1 ($t_4 = 3,29$, $p = 0,035$) y mGlu5 ($t_4 = 11,61$, $p = 0,0003$) en el HPC dorsal en comparación con los animales que recibieron vehículo (Figura 35).

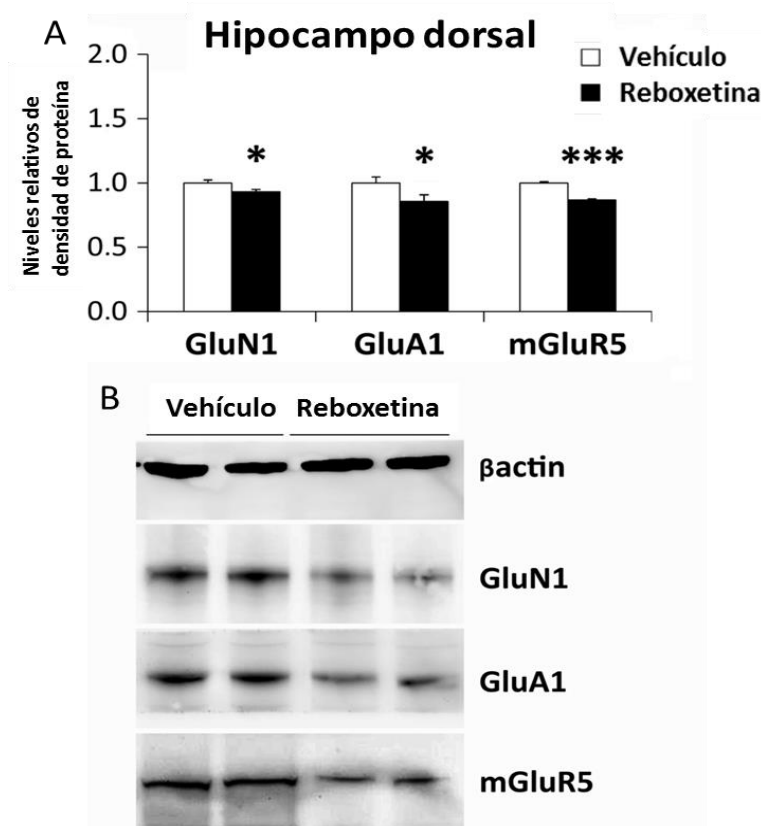


Figura 35. Efecto del tratamiento con reboxetina sobre la densidad de proteína de los componentes del sistema glutamatérgico en el HPC dorsal. A: Niveles relativos de densidad de proteína. B: Muestra de las bandas de proteína cuantificadas. Los datos representan la media \pm SEM ($n = 3-6$ por grupo) de la densidad de proteína. Análisis Post hoc: * / *** $p < 0,05 / 0,0001$ vs grupo vehículo.

7.2.3 Efectos del tratamiento con reboxetina en los niveles relativos de ARNm y densidad de proteína de los componentes del SEC en la corteza prefrontal y el hipocampo dorsal

La prueba t de Student de muestras no relacionadas reveló que los animales que recibieron tratamiento con reboxetina presentaron una disminución en los niveles relativos de ARNm de *Ppara* ($t_{14} = 2,48$, $p = 0,026$), *Dagla* ($t_{14} = 2,37$, $p = 0,032$) y *Daglβ* ($t_{14} = 2,26$, $p = 0,040$) en la CPF en comparación con los animales que recibieron vehículo. No se encontraron diferencias debidas al tratamiento en los niveles de ARNm de *cnr1*, *cnr2*, *Pparγ*, *Nape-pld*, *Faah* y *Mgll* en la CPF de los animales ($p > 0,05$, NS) (Figura 36).

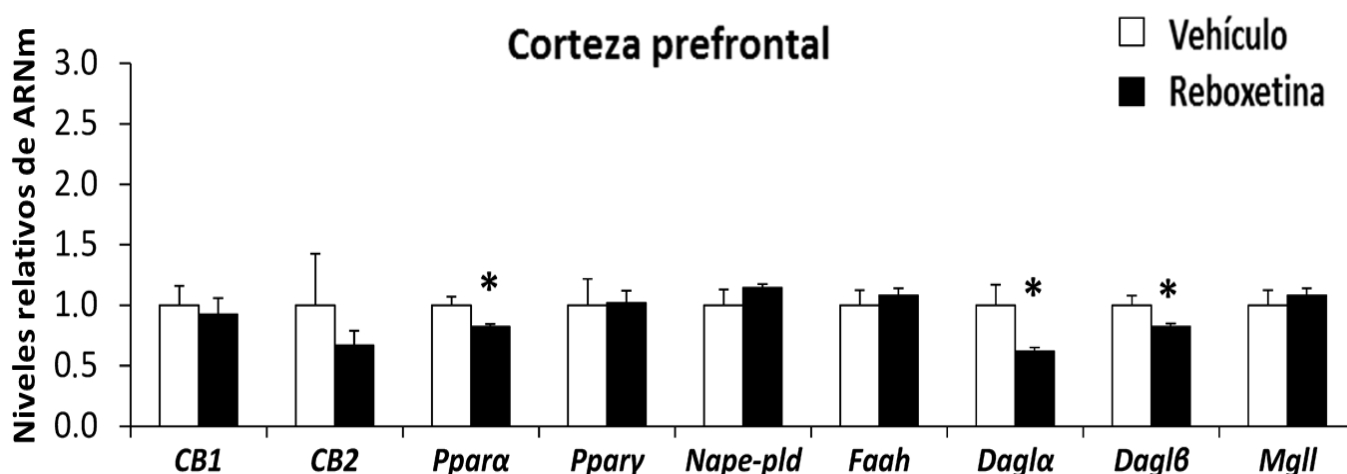


Figura 36. Efectos del tratamiento con reboxetina sobre los niveles relativos de ARNm de los genes vinculados al SEC en la CPF. Los datos representan la media \pm SEM ($n = 6-8$ por grupo) de la expresión génica relativa obtenida mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Análisis *Post hoc*: * $p < 0,05$ vs grupo vehículo.

Con respecto a los niveles de densidad de proteína, la prueba t de Student de muestras no relacionadas indicó que los animales que recibieron tratamiento con reboxetina mostraron una disminución en los niveles de proteína de CB1 ($t_4 = 2,98$, $p = 0,008$), PPAR α ($t_4 = 3,15$, $p = 0,006$), DAGL α ($t_4 = 2,86$, $p = 0,018$), DAGL β ($t_4 = 5,92$, $p = 0,004$) y MAGL ($t_4 = 9,27$, $p < 0,001$) en la CPF en comparación con los animales que recibieron vehículo (Figura 37).

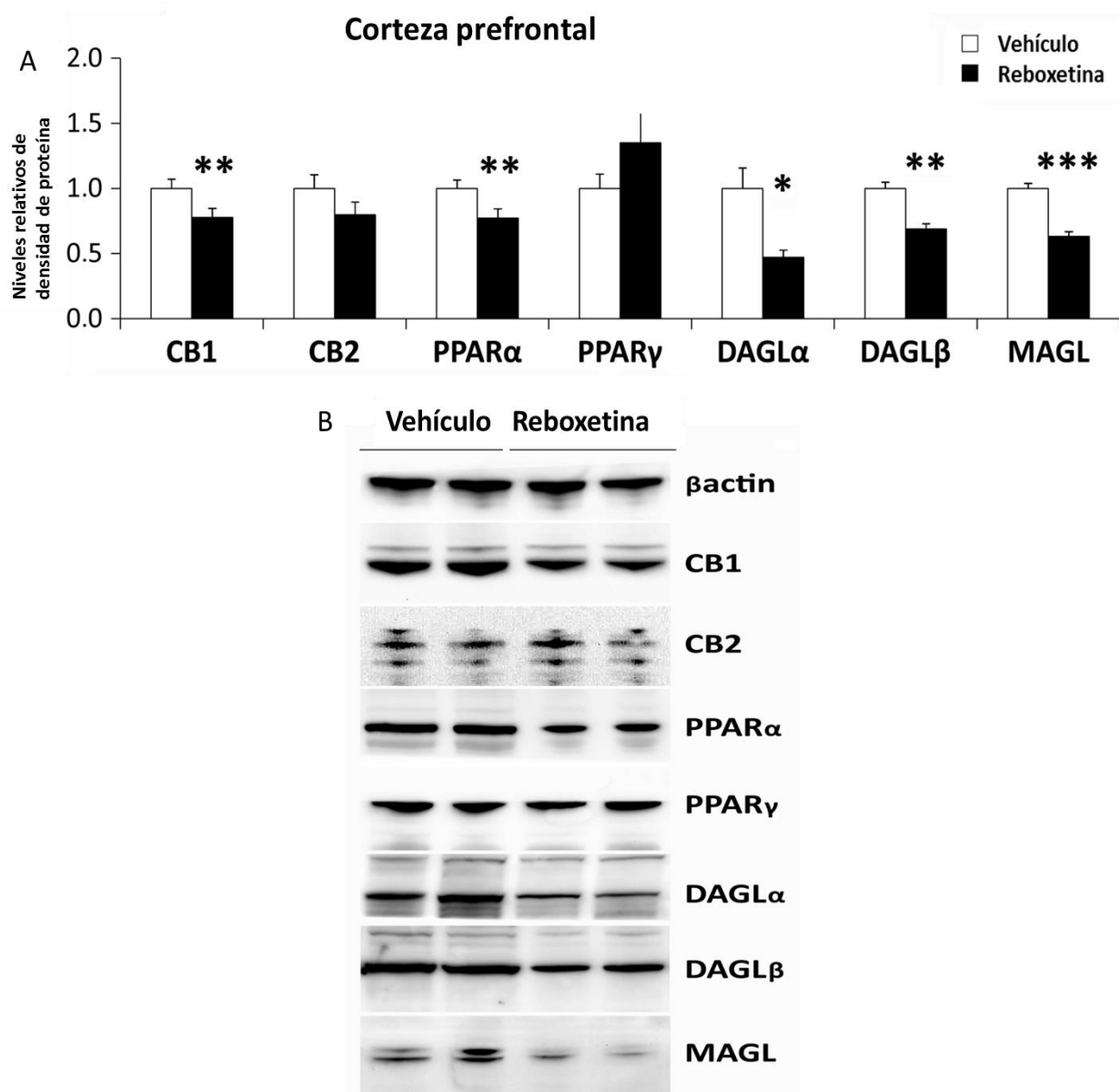


Figura 37. Efecto del tratamiento con reboxetina sobre la densidad de proteína de los componentes del sEC en la CPF. A: Niveles relativos de densidad de proteína. B: Muestra de las bandas de proteína cuantificadas. Los datos representan la media \pm SEM ($n = 3-6$ por grupo) de la densidad de proteína. Análisis Post hoc:

* / ** / *** $p < 0,05$ / $0,001$ / $0,0001$ vs grupo vehículo.

La prueba t de Student de muestras no relacionadas reveló que los animales que recibieron tratamiento con reboxetina no presentaron diferencias significativas en la expresión de ninguno de los genes relacionados con el sEC en el HPC dorsal con respecto a los animales que recibieron vehículo ($p > 0,05$, NS) (Figura 38).

No obstante, en lo que a la densidad de proteína respecta, el análisis reveló que los animales que recibieron reboxetina mostraron una disminución de densidad de proteína DAGLα ($t_4 = 2,64$, $p = 0,05$), en ausencia de diferencias de las demás proteínas analizadas ($p > 0,05$, NS) (Figura 39).

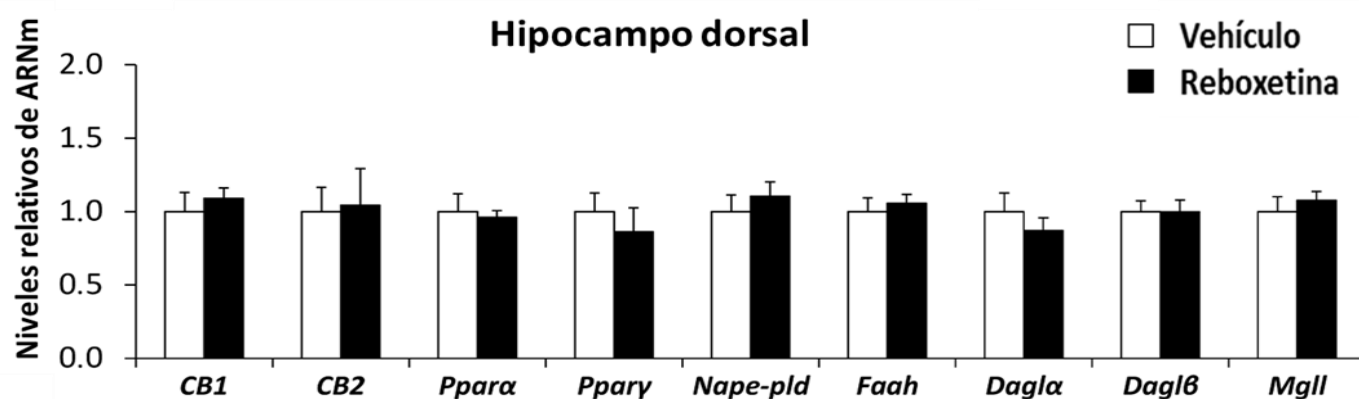


Figura 38. Efectos del tratamiento con reboxetina sobre los niveles relativos de ARNm de los genes vinculados al SEC en el HPC dorsal. Los datos representan la media \pm SEM ($n = 6-8$ por grupo) de la expresión génica relativa obtenida mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

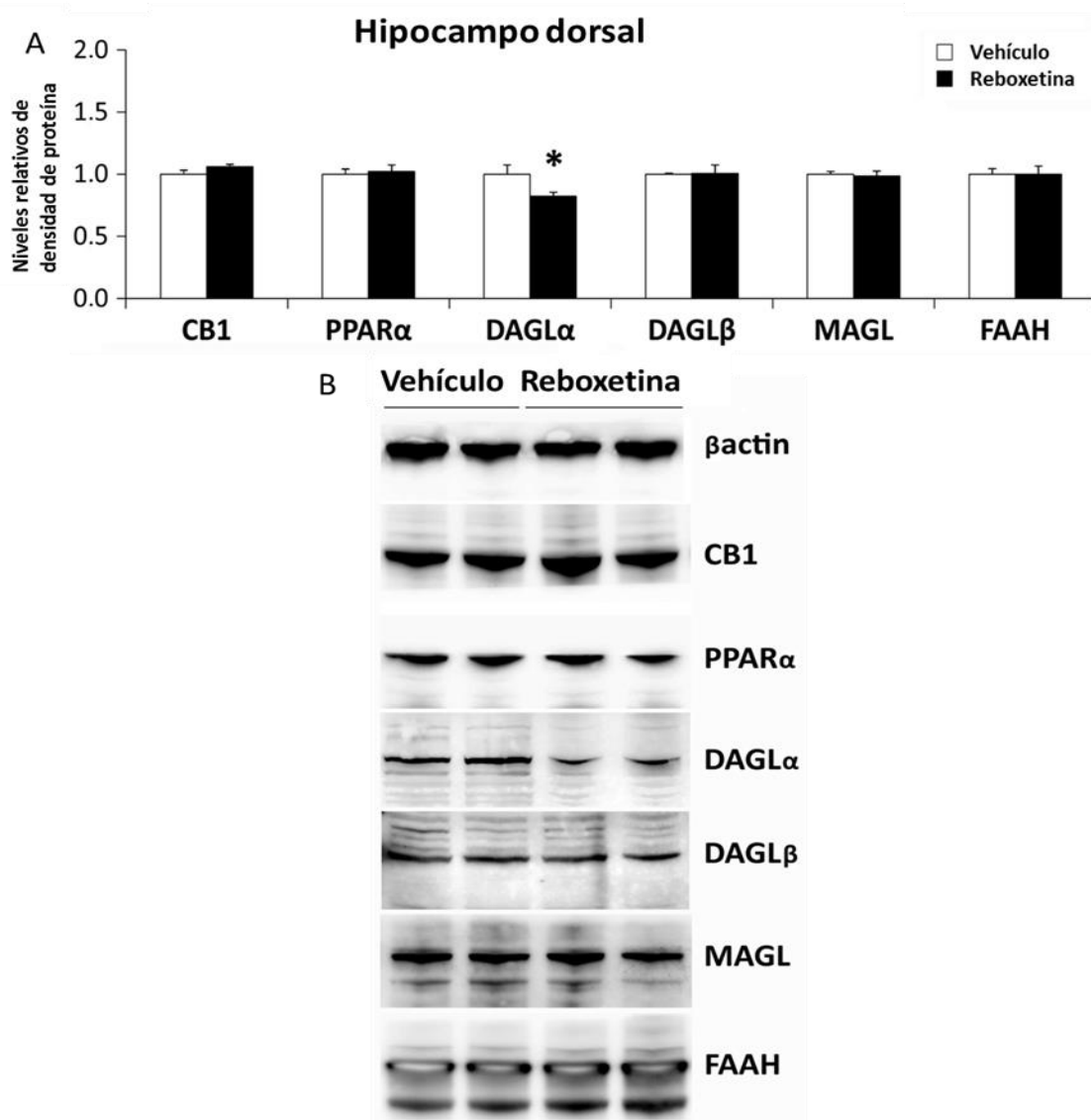


Figura 39. Efecto del tratamiento con reboxetina sobre la densidad de proteína de los componentes del SEC en el HPC dorsal. A: Niveles relativos de densidad de proteína. B: Muestra de las bandas de proteína cuantificadas. Los datos representan la media \pm SEM ($n = 3-6$ por grupo) de la densidad de proteína. Análisis Post hoc: * $p < 0,05$ vs grupo vehículo.

7.3 RESULTADOS ESTUDIO 3 (ANEXO 3)

El estudio 3 parte de un objetivo teórico, que ha dado como resultado la publicación de un capítulo de libro (anexo 3). Los resultados de este estudio serían, por tanto, dicho capítulo. En este apartado se hace un breve resumen de los principales contenidos de dicho estudio.

7.3.1 Los efectos del tratamiento antidepresivo sobre la recaída en el consumo de alcohol y la neurogénesis del hipocampo

Varios estudios muestran que revertir la sintomatología depresiva (Suter et al., 2011) y la neurodegeneración del HPC (Mandyam y Koob, 2012) podría ser una opción terapéutica en la comorbilidad del TUA y la depresión. Teniendo en cuenta el potencial del tratamiento antidepresivo a la hora de aliviar la sintomatología depresiva y de promover la neurogénesis en el HPC, parece razonable pensar que este tratamiento podría beneficiar a los pacientes con TUA.

7.3.1.1 Evidencia clínica de los efectos del tratamiento antidepresivo en la depresión y la neurogenesis en el HPC

Los meta-análisis y revisiones que integran resultados de los estudios clínicos en los que los pacientes con TUA y depresión fueron tratados con antidepresivos muestran resultados inconcluyentes y algunas diferencias en función del fármaco empleado. Algunos hallazgos mostraron que los ISRSs tratarían adecuadamente los síntomas depresivos en pacientes con TUA y depresión (Danovitch et al., 2017; Davis et al., 2012; Nunes y Levin, 2004), mientras que otros indicarían que esta familia de antidepresivos no mostrarían una eficacia superior al placebo en el tratamiento de pacientes comórbidos (Iovieno et al., 2011; Zhang et al., 2018). Además, algunos autores señalan que los ISRS no mostrarían mejores efectos que los ATCs (Torrens et al., 2004). De hecho, los resultados obtenidos en diferentes estudios que emplearon antidepresivos parecen converger en la eficacia de los ATCs a la hora de aliviar la sintomatología depresiva (Cornelius et al., 2016; Iovieno et al., 2011). La incongruencia de los resultados podrían reflejar diferencias en la respuesta a un tratamiento para la

depresión en pacientes con TUA en función del tipo de depresión comórbida, al haberse observado un mayor efecto en pacientes con depresión inducida que en pacientes con depresión independiente (Foulds et al., 2015b). El meta-análisis más reciente disponible sobre la eficacia del tratamiento antidepresivo en estos pacientes muestra un efecto modesto en algunos aspectos de la depresión (Agabio et al., 2018). Sin embargo, los autores señalan la necesidad de un mayor número de estudios que converjan en la utilización de las medidas de evaluación, en los criterios de selección y descripción de la muestra, así como en la dosis y duración del tratamiento para que la integración de los mismos pueda llegar a conclusiones con una evidencia fiable (Agabio et al., 2018; Nunes y Levin, 2004; Torrens et al., 2004), y algunos enfatizan en la necesidad de evaluar antidepresivos con mecanismos de acción alternativos, como los inhibidores de la recaptación de monoaminas no selectivos o parciales (Belmer et al., 2016; Nunes y Levin, 2008). Finalmente, aunque se ha observado que el tratamiento antidepresivo podría aumentar la neurogénesis del HPC en pacientes depresivos (Boldrini et al., 2009; 2012; 2013; 2014), no hemos encontrado evidencias de que esto pueda suceder en pacientes con TUA.

7.3.1.2 Evidencia preclínica de los efectos del tratamiento antidepresivo sobre la conducta de tipo depresivo y la neurogénesis en el HPC en la abstinencia de alcohol

Los estudios en animales han sugerido que el potencial del tratamiento antidepresivo de promover la neurogénesis en el HPC estaría relacionada con sus efectos terapéuticos observados en la conducta (Tanti y Belzung, 2013). De hecho, los autores señalan que el aumento de la neurogénesis en el HPC ha demostrado ser necesario y suficiente para reducir el comportamiento de tipo depresivo en los animales (Hill et al., 2015). Por el contrario, otros autores han concluido que, aunque los antidepresivos promueven la neurogénesis en el HPC, este no sería un evento crítico para sus efectos sobre la recuperación de las alteraciones afectivas (Bessa et al., 2009). En la misma dirección, los autores han propuesto que el efecto terapéutico del antidepresivo no viene determinado exclusivamente por un aumento en el número de

nuevas neuronas generadas, sino por la manera en que esas neuronas se incorporan de forma funcional a los circuitos preexistentes del HPC vinculados con la recuperación (Mateus-Pinheiro et al., 2013). Pocos estudios en animales han evaluado la eficacia de un tratamiento antidepresivo (desipramina, imipramina y amitifadina) en un modelo de exposición al alcohol. Dos estudios encontraron que el tratamiento subcrónico con desipramina e imipramina revertía el comportamiento de tipo depresivo y la ansiedad en roedores en condiciones de abstinencia temprana de alcohol (Getachew et al., 2008; 2017). Del mismo modo, otro estudio señalaba que dos dosis diferentes de amitifadina, administradas de forma aguda, previnieron la conducta de tipo depresivo en animales expuestos a la abstinencia de alcohol (Warnock et al., 2012). Finalmente, otro estudio mostró que la desipramina administrada de forma subcrónica revirtió el comportamiento de tipo depresivo y restauró los niveles de neurogénesis en el HPC que se encontraban deteriorados bajo condiciones de abstinencia prolongada en ratones (Stevenson et al., 2009). De manera similar, otros estudios han probado la eficacia de otros fármacos de tipo antidepresivo como el 7,8-DHF, un agonista del receptor de tirosina quinasa B (trkB) (Briones y Woods, 2013); tricotatina A, un inhibidor de la histona deacetilasa A (Sakharkar et al., 2016); rolipram, un inhibidor de la fosfodiesterasa 4 (Gong et al., 2017); o ketamina (antagonista NMDA) (Holleran et al., 2016, Vranjkovic et al., 2018), indicando que estos tratamientos también restablecieron los niveles de neurogénesis en el HPC y/o previnieron la aparición de la conducta de tipo depresivo inducida por la exposición y la abstinencia al alcohol. Además, otras condiciones no farmacológicas, como el ejercicio o los extractos naturales, indujeron patrones similares de recuperación en la neurogénesis del HPC (Maynard y Leasure, 2013; Vetreno et al., 2018) y en el comportamiento de tipo depresivo (Kim et al., 2017; Pang et al., 2013) en roedores en condiciones de exposición y abstinencia de alcohol.

Estos datos, junto con estudios previos que usaron antidepresivos monoaminérgicos, sugerirían que cuando un tratamiento tuviera efectos protectores sobre los procesos de neurogénesis en el HPC, también podría reflejar su efecto terapéutico sobre las alteraciones afectivas en animales en la abstinencia alcohólica. Sin embargo, la causalidad de esta relación debería ser comprobada en estudios futuros.

7.3.1.3 Evidencia clínica de la eficacia del tratamiento antidepresivo en el curso del TUA y la depresión

Aunque los antidepresivos no se encuentran entre las opciones de tratamiento de primera línea en el TUA, si se cuentan entre los tratamientos alternativos disponibles, principalmente bajo condiciones de comorbilidad (Soyka y Müller, 2017). En este sentido, se ha propuesto que el tratamiento con antidepresivos podría mejorar aspectos relacionados con el consumo de alcohol (Graham y Massak, 2007), posiblemente mejorando los síntomas depresivos (Mann, 2004). Algunos de los estudios y el meta-análisis mencionados anteriormente también evaluaron los resultados relacionados con el alcohol en pacientes con TUA y depresión (Agabio et al., 2018; Nunes y Levin, 2004; Torrens et al., 2004), mostrando una eficacia modesta o nula del tratamiento sobre algunos aspectos relacionados con el consumo de alcohol. Las conclusiones recientes muestran que los antidepresivos aumentaron el número de participantes en abstinencia durante los ensayos y redujeron el número de bebidas por día, mientras que no se reportaron diferencias entre el antidepresivo y el placebo en otros resultados relevantes del TUA (Agabio et al., 2018). Además de la modesta efectividad general, es importante mencionar que algunos estudios mostraron un empeoramiento en aspectos ligados al consumo de alcohol en los pacientes que recibieron tratamiento con ISRSs (Charney et al., 2015; Chick et al., 2004; Dundon et al., 2004). En relación a estos estudios, varios autores han informado de casos en los que el tratamiento con ISRSs podrían ser la causa de un aumento en el número de episodios de intoxicación por alcohol e incluso de la aparición de casos de TUA (Atigari et al., 2013; Brookwell et al., 2014; Menkes y Herxheimer, 2014). Finalmente, los pacientes con TUA y problemas de ansiedad comórbidos también podrían aumentar el consumo de alcohol bajo el tratamiento con ISRSs (Gimeno et al., 2017).

7.3.1.4 Evidencia preclínica de la eficacia del tratamiento antidepresivo en la recaída en el consumo de alcohol

Los datos preclínicos sobre la efectividad de los tratamientos farmacológicos en el TUA son todavía escasos (Barajaz y Kliethermes, 2017). Se ha constatado que, tras un periodo de abstinencia, tanto los ISRSs como los IRSNs, administrados de forma aguda un día antes de la re-exposición al alcohol pueden reducir el consumo en animales dependientes del alcohol a corto plazo (Simon O'Brien et al., 2011). No obstante, teniendo en cuenta que la evaluación de la efectividad del tratamiento antidepresivo debe realizarse considerando la demora en su efecto terapéutico, los estudios deben ir más allá de las evaluaciones a corto plazo, realizando una evaluación prolongada sobre las consecuencias del tratamiento en modelos animales que reflejen lo mejor posible las condiciones de los pacientes con TUA (Bell et al., 2017). Así, a diferencia de los estudios que utilizan tratamientos agudos, los autores que evaluaron los tratamientos prolongados con escitalopram, sertralina, paroxetina, fluoxetina (ISRSs) y duloxetina (IRSN), encontraron que, a lo largo del período de tratamiento, los animales reducían el consumo de alcohol, pero el cese del tratamiento producía una restauración de los niveles de consumo previos (basales) (Ho et al., 2016; Gulley et al., 1995; Skelly y Weiner, 2014). De hecho, Ho et al., 2016 también encontraron un aumento en la ingesta de alcohol en animales sometidos a estrés crónico leve una vez retirado el tratamiento con escitalopram. Curiosamente, los autores también encontraron el mismo efecto en animales bajo la combinación de tratamientos con escitalopram y acamprosato. En relación a estos datos, estudios de nuestro laboratorio han mostrado que algunos de estos antidepresivos (ISRSs y IRSNs) producirían un aumento sostenido en el tiempo sobre los niveles de consumo de alcohol en animales tratados a lo largo de un periodo de abstinencia y re-expuestos al alcohol al finalizar el tratamiento crónico (Alén et al., 2013).

7.3.1.5 Conclusiones

La traslación de los resultados de los estudios preclínicos a la práctica clínica sigue siendo un reto importante en el desarrollo de nuevos tratamientos farmacológicos en el TUA. Lo primero que debemos señalar es la escasez de estudios que han evaluado la eficacia del tratamiento de antidepresivo en modelos animales de exposición y abstinencia al alcohol. En este sentido, es importante destacar los numerosos estudios en animales que evalúan el impacto de la exposición al alcohol y la abstinencia sobre aspectos afectivos y los parámetros neurogénesis en comparación con los escasos estudios que intentan revertir tales efectos mediante el uso de tratamientos farmacológicos apropiados. Además, los autores señalan la necesidad de contemplar criterios estrictos a la hora de evaluar la eficacia de tratamientos farmacológicos en modelos animales de TUA, como el uso de procedimientos de autoadministración y la evaluación de la dependencia mediante el análisis de la abstinencia y la conducta de recaída. En este sentido, los estudios en animales que evaluaron las alteraciones en la neurogénesis hipocampal utilizaron principalmente períodos cortos (4 días) de exposición forzada al alcohol, mientras que otros modelos de autoadministración prolongada y/o intermitente, que representan de forma más fiel aspectos importantes de los patrones de consumo de alcohol en pacientes con TUA, se utilizaron en menor medida. Una de las limitaciones metodológicas más reseñables a la hora de comparar los resultados clínicos y preclínicos vendría determinada por el período en el que se inicia el tratamiento antidepresivo. Los estudios preclínicos indicarían que los animales pueden mostrar diferentes respuestas afectivas ante el tratamiento en función del momento en que este es administrado. Además, el cese del tratamiento con algunos antidepresivos puede tener repercusiones negativas en el consumo de alcohol y en la recaída. Aunque estos efectos deben aclararse más en estudios futuros, los ensayos clínicos deben tener en cuenta este posible efecto adverso.

El debate sobre la implicación de las nuevas neuronas generadas en el HPC como consecuencia de la abstinencia del alcohol sigue siendo objeto de estudio. A pesar de que las alteraciones en la neurogenesis hipocampal inducidas por el alcohol persisten durante la abstinencia, algunos estudios han mostrado aumentos en los

parámetros de proliferación neural en animales, principalmente a lo largo de los períodos de abstinencia temprana. Inicialmente se planteó el posible papel de este efecto como un factor de recuperación, pero estudios posteriores apuntarían incluso a hipótesis opuestas. En este sentido, otros hallazgos llevaron a cuestionar si las neuronas generadas durante este proceso neurogénico reactivo sobreviven o se integran adecuadamente en los circuitos hipocampales existentes para contribuir a la funcionalidad y la recuperación de esta estructura. Además, un aumento temprano en la proliferación de neuronas inducida durante la abstinencia, seguido de una reducción en la supervivencia de las mismas en la abstinencia prolongada, parece dar lugar a un aumento de la autoadministración de alcohol en la recaída. Por lo tanto, este aparente papel dual inducido por la neurogénesis en el HPC y los consiguientes cambios en el comportamiento adictivo deben ser estudiados en mayor profundidad.

En resumen, existe una sólida evidencia preclínica de que el consumo de alcohol y la abstinencia conducen a estados afectivos negativos y alteraciones en la neurogénesis del HPC, algunos de los cuales pueden persistir en la abstinencia prolongada. Aunque sí se han analizado las alteraciones afectivas relacionadas con el alcohol, la información disponible en relación al deterioro neurogénico inducido por el consumo de alcohol en pacientes clínicos es escasa. Tanto la depresión como los cambios en la neurogénesis inducidos por el alcohol podrían ser factores relevantes que precipitarían la recaída, exacerbando el curso del TUA, aunque estudios adicionales deberían aclarar esta compleja interacción. Los antidepresivos convencionales parecen aliviar las alteraciones afectivas en parte mediante la promoción los procesos neurogénicos en el HPC, por lo tanto, los pacientes con depresión TUA podrían beneficiarse de sus efectos. Desafortunadamente, los ensayos clínicos aún afrontan importantes limitaciones para poder extraer conclusiones a este respecto de forma fiable. Además, los estudios preclínicos deben tener en cuenta importantes aspectos metodológicos a la hora de trasladar información sobre la eficacia del tratamiento antidepresivo en pacientes con TUA.

8. DISCUSIÓN

Este trabajo tiene como principal objetivo analizar y comparar los efectos del tratamiento subcrónico antidepresivo con mecanismos de acción específicos sobre el consumo de alcohol en la recaída en un modelo animal basado en el ADE. Los datos obtenidos sobre el consumo de alcohol en los animales en el periodo de recaída revelan que el tratamiento subcrónico (14 días) con antidepresivos de distinto mecanismo de acción da lugar a patrones específicos de consumo. Concretamente, los tratamientos con fluoxetina y reboxetina administrados durante la abstinencia alcohólica inducen un aumento que puede incluso llegar a duplicar los niveles basales de consumo de alcohol durante la re-exposición al mismo. En este sentido, los datos reflejan que la reboxetina podría inducir una escalada en el consumo tal y como se había observado previamente en los animales tratados con fluoxetina a largo plazo. Por otro lado, el bupropion ha sido el único tratamiento antidepresivo que no ha tenido efectos negativos sobre el consumo de alcohol en los animales bajo nuestras condiciones experimentales.

Como se ha mencionado en la introducción, la evidencia preclínica sobre la eficacia de los tratamientos farmacológicos en el TUA requiere de un mayor número de estudios que analicen las consecuencias a largo plazo que el tratamiento pudiera tener sobre la recuperación del consumo de alcohol (Bell et al., 2017). Teniendo en cuenta, además, el uso frecuente de antidepresivos en pacientes con TUA, resulta especialmente necesario estudiar las posibles repercusiones que este tratamiento pudiera tener sobre el consumo de alcohol. Sin embargo, los estudios preclínicos que han evaluado el papel del antidepresivo sobre el consumo de alcohol una vez finalizado el tratamiento y después de la abstinencia son escasos y carecen de la amplitud necesaria para evaluar las consecuencias del tratamiento crónico sobre el consumo a largo plazo.

Los resultados en relación al efecto que produce el tratamiento antidepresivo con fluoxetina sobre el consumo de alcohol en la recaída que hemos obtenido vienen respaldados por los de estudios previos de nuestro laboratorio (Alén et al., 2013) y los de otros equipos de investigación que han empleado una metodología muy similar a la de este trabajo (Suárez et al., 2019), mientras que los datos obtenidos en animales tratados con reboxetina se corresponderían con algunos resultados que hemos

obtenido en estudios preliminares (Alén et al., 2016) y empleando fármacos cuyo mecanismo de acción implicaría a la señalización noradrenérgica, como la atomoxetina (ISRN) o la venlafaxina (IRSN) (Alén et al., 2013; 2014). Por otro lado, Simon O'Brien et al., 2011 observaron que el tratamiento agudo con fluoxetina y con milpracilam (IRSN) reducía la auto-administración de alcohol tras un periodo de abstinencia en ratas Wistar un día después de su administración. Los estudios sobre los efectos de la reboxetina y el bupropion sobre el consumo de alcohol son igualmente escasos. A pesar de ello, estudios recientes han mostrado que el bupropion en dosis de 10 y 20 mg/kg no tendría efectos sobre el consumo de alcohol (Nicholson et al., 2018; Zhou et al., 2019), algo similar a lo que muestran nuestros datos. Si bien, un estudio más reciente muestra que el bupropion a una dosis de 40 y 60 mg/kg, administrado de forma concomitante a la exposición al alcohol, si podría reducir el consumo voluntario en ratones sometidos a un protocolo crónico de exposición intermitente al alcohol (Navarro et al., 2019). La diferencia en estos resultados con respecto a lo que hemos obtenido en los animales que recibieron bupropion en nuestro estudio podría deberse al protocolo de exposición al alcohol o a la administración concomitante del fármaco durante el consumo, no obstante, de forma similar a nuestros datos, los autores encontraron que las dosis no superiores a 20 mg/kg no alteraban significativamente el consumo de alcohol en los animales. Actualmente, la continuación de los estudios relacionados con este trabajo nos ha llevado a encontrar que una dosis de bupropion de 60 mg/kg tampoco aumentaría el consumo en la recaída (datos no publicados, 2019).

Como se menciona anteriormente, el modelo basado en el ADE ha resultado una herramienta útil en la evaluación de fármacos dirigidos a prevenir la recaída en el consumo (Vengeliene et al., 2014). En este sentido, cabe señalar que, si bien tanto la fluoxetina como reboxetina parecen atenuar el ADE (ver Alén et al., 2013 y anexo 2), también observamos que el tratamiento con estos fármacos termina resultando en un aumento en el consumo mantenido al menos durante las 3 semanas en las que éste se ha evaluado. Con respecto a los animales que recibieron fluoxetina, es posible que los datos obtenidos durante los primeros días de la recaída estén reflejando efectos agudos del tratamiento. Por ejemplo, la activación de receptores de 5-HT a consecuencia de la última dosis de fluoxetina podría explicar el consumo de los

animales el primer día de la recaída (Wilson et al., 2000). Por otro lado, con respecto a los animales que recibieron reboxetina, es también probable que los niveles de consumo durante la primera sesión de la recaída en estos animales estén relacionados con un efecto agudo del último tratamiento, teniendo en cuenta los resultados preliminares de nuestro laboratorio, en el que una dosis de reboxetina mostró reducir el consumo de alcohol en los animales (Alén et al., 2016). Finalmente, atendiendo a algunos aspectos farmacocinéticos de los antidepresivos, es posible que estos pudieran ejercer efectos sobre el consumo por medio de metabolitos activos (como la norfluoxetina) después de su administración (ver en Alén et al., 2013; Suárez et al., 2019). Por el contrario, el progresivo aumento en el consumo estaría explicado por fenómenos de neuroadaptación inducidos por el tratamiento crónico que persistirían durante la recaída, un fenómeno que, paradójicamente, se correspondería con el momento en que tendría lugar el efecto terapéutico propio del antidepresivo.

Desde un enfoque neurobiológico, el mecanismo de acción de cada antidepresivo podría contribuir a explicar los patrones de consumo observados. Así, cabe suponer que parte de los efectos del tratamiento con ISRSs e ISRNs sobre el consumo de alcohol en modelos animales guardarían relación con la inhibición de la recaptación de 5-HT y de noradrenalina. Aunque estos mecanismos, actuando de forma concurrente a la exposición al alcohol, inducían una disminución en el consumo en roedores (Dauost et al., 1984; Gulley et al., 1995; Ho et al., 2016; Simon O'Brien et al., 2011), la implicación a largo plazo de los mismos en la motivación por retomar el consumo parece ser más compleja. En este sentido, la activación de los distintos subtipos de receptores 5-HT podría tener un efecto bidireccional en la motivación por la recuperación del consumo. Se ha señalado, por ejemplo, que, durante la exposición al alcohol, la manipulación de la señal 5-HT que aumentara la activación de los receptores 5-HT_{2C} podría incrementar el estado afectivo negativo derivado de la abstinencia alcohólica, promoviendo la recaída. Teniendo en cuenta que los ISRSs aumentarían la disponibilidad de la 5-HT sobre sus diferentes receptores, cabe pensar que parte de los efectos negativos de esta familia de antidepresivos guardaran relación con esta interacción (Marcinkiewicz, 2015; Marcinkiewicz et al., 2016). De forma análoga, se ha propuesto que un aumento en la señalización noradrenérgica podría constituir un potenciador de la motivación por retomar el consumo de alcohol (Koob,

2014), algo que podría estar viéndose reflejado en nuestros estudios previos en los que la venlafaxina y la atomoxetina (cuyo mecanismo de acción común consiste en la inhibición de la recaptación de noradrenalina) inducían un aumento de la auto-administración de alcohol en la recaída en el consumo (Alén et al., 2013; 2014) de forma similar a lo observado con la reboxetina. La atomoxetina presentaría un efecto negativo que se desvanecería progresivamente, mientras que la reboxetina induciría una escalada ascendente en el consumo. Cabe la posibilidad de que la dosis de la atomoxetina o el modelo animal de consumo de alcohol (el paradigma de libre elección) utilizados pudieran contribuir a explicar el hecho de que dos mecanismos de acción semejantes puedan dar lugar a patrones de recaída distintos. Por otro lado, la interacción de la atomoxetina con transportadores de otras monoaminas, como la dopamina (Bymaster et al., 2002), podría indicar que un mecanismo de acción relacionado con la señal dopaminérgica induciría un efecto negativo menor sobre el consumo. Finalmente, el mecanismo de acción del bupropion es el que difiere en mayor medida de los demás antidepresivos, precisamente por su afinidad por los transportadores de dopamina. De hecho, cabe la posibilidad de que los efectos observados sobre el consumo de alcohol en los animales tratados con bupropion estén relacionados con la señalización de este neurotransmisor. Así, por ejemplo, estudios previos muestran que la administración crónica de inhibidores de la recaptación de dopamina durante la exposición al alcohol no alteraría significativamente el consumo en animales (Daoust et al., 1984). Además, un meta-análisis reciente indica que durante la abstinencia alcohólica tendría lugar una alteración bifásica de la señalización dopaminérgica (una hipoactivación seguida de un estado hiperdopaminérgico) que podría finalmente constituir un marco de vulnerabilidad para la recaída en el consumo (Hirth et al., 2016). En este contexto, una inhibición de la recaptación de dopamina facilitada por el bupropion en la abstinencia temprana podría atenuar el patrón bifásico de la señal dopaminérgica en la abstinencia alcohólica, y podría explicar el hecho de que los animales que recibieron bupropion no incrementaran su consumo de alcohol. No obstante, el bupropion tiene un mecanismo de acción dual, que inhibe la recaptación de dopamina y, en menor medida, de noradrenalina. Teniendo en cuenta que este mecanismo adicional guarda relación con aumentos en el consumo, resulta interesante que los animales tratados con bupropion

no mostraran cambios en la conducta de auto-administración. Esto podría indicar que una débil afinidad del bupropion por los transportadores de noradrenalina no tendría las consecuencias que otros antidepresivos, como la atomoxetina, la venlafaxina o la reboxetina, tendrían sobre la recaída en el consumo.

Desde un enfoque teórico, cabe la posibilidad que el efecto de algunos antidepresivos, como la fluoxetina o la reboxetina, puedan tener repercusiones negativas sobre el consumo de alcohol en base a un mecanismo de sensibilización cruzada (Robinson y Berridge 1993), es este caso, que el tratamiento antidepresivo promoviera un aumento en el valor incentivo del alcohol. Así por ejemplo, diferentes estudios han encontrado efectos de sensibilización motora debidos al tratamiento con fluoxetina ante la administración de alcohol (Goeldner et al., 2005) y anfetamina (Alén et al., 2013), algo que podría implicar a la señalización monoaminérgica y repercutir así indirectamente en la señal reforzante del alcohol, contribuyendo a los patrones de consumo observados en la recaída (Alén et al., 2013). No obstante, los animales tratados con fármacos que inhiben la recaptación de noradrenalina (atomoxetina y venlafaxina) no mostrarían los efectos de sensibilización motora mencionados, aunque no descartamos la posibilidad de que una sensibilización a los efectos reforzantes del alcohol hubiera tenido lugar en ausencia de las alteraciones motoras en estos animales (Alén et al., 2013; 2014).

En conjunto, los resultados sugieren que los mecanismos de acción de la fluoxetina, la reboxetina, o la venlafaxina, por medio de la recaptación de 5-HT y noradrenalina, podrían inducir alteraciones que promovieran un aumento en el consumo de alcohol durante la recaída. Por otro lado, un mecanismo de acción dirigido principalmente a inhibir la recaptación de noradrenalina y parcialmente a la de dopamina, como el de la atomoxetina, tendría un efecto negativo sobre el consumo que sería menos duradero que con los antidepresivos antes mencionados. Finalmente, un mecanismo de acción con una afinidad mayor por los transportadores de dopamina que por los de noradrenalina, característico del bupropion, podría no tener las repercusiones negativas sobre la recaída en el consumo que se ha observado con el resto de antidepresivos analizados.

El segundo objetivo principal de este trabajo consiste en analizar los posibles cambios en los principales receptores y enzimas del SEC y el sistema glutamatérgico en

las estructuras cerebrales relacionadas en el consumo de alcohol (CPF e HPC) de los animales expuestos a la recaída consumo y que recibieron tratamiento antidepresivo con distintos mecanismos de acción. Nuestros resultados muestran que los animales que fueron tratados con fluoxetina, reboxetina y bupropion presentarían alteraciones específicas en los niveles de ARNm y de densidad de proteína dependiendo de su mecanismo de acción, pero al mismo tiempo, algunas de estas alteraciones resultan ser similares en los 3 grupos de animales que recibieron antidepresivos en comparación con los animales que recibieron vehículo y otras estarían presentes en los animales tratados con antidepresivos (bupropion y reboxetina) con un mecanismo de acción semejante (la inhibición de la recaptación de noradrenalina).

Por un lado, en lo que a las alteraciones en el sistema glutamatérgico se refiere, cabe destacar la marcada reducción en las subunidades N1 y A1 de los receptores ionotrópicos de glutamato en la CPF y el HPC de los animales tratados con los 3 antidepresivos (fluoxetina, reboxetina y bupropion), además del incremento en la expresión génica de las distintas subunidades del receptor AMPA (A2 y A3). Además, algunas alteraciones encontradas en los animales tratados con bupropion y reboxetina, como una disminución en la densidad de proteína del receptor mGlu5, podrían responder al mecanismo de acción común de estos 2 antidepresivos.

Por otro lado, en lo que a las alteraciones del sEC respecta, los animales tratados con los 3 antidepresivos mostraron una reducción de los niveles de ARNm y/o de densidad de proteína en PPAR α y DAGL α , la enzima encargada de la síntesis de 2-AG. Además, los animales tratados con bupropion y reboxetina mostraron, a nivel cortical, una reducción en la expresión del receptor CB1, así como de MAGL, la enzima de degradación de 2-AG.

Finalmente, a pesar de que los fármacos han tenido efectos similares sobre estos sistemas, cabe destacar algunas alteraciones específicas de cada antidepresivo encontradas en componentes del sEC, de entre las cuales destacaría especialmente el marcado incremento en la expresión del receptor CB2 en los animales que recibieron tratamiento con fluoxetina.

En primer lugar, la literatura disponible indica que en la exposición y la abstinencia de alcohol tendrían lugar una hiperactivación glutamatérgica, caracteriza principalmente por un incremento en la expresión de NMDA, pero no de AMPA, y de

algunos receptores metabotrópicos de glutamato de forma relativamente homogénea en diversas regiones encefálicas, incluyendo la CPF y el HPC (ver en Alasmari et al., 2018; Gerace et al., 2019; Roberto y Varodayan, 2017 ; Woodward Hopf y Mangieri, 2018; figura 17). Por otro lado, varios estudios indican que, tras la exposición crónica al alcohol, tendría lugar una reconfiguración compensatoria del sEC, caracterizada por una oscilación en la expresión de CB1 y de la señalización de ECs a lo largo de la abstinencia (ver en Henderson-Redmond et al., 2016; Pava y Woodward, 2012; figura 23).

En segundo lugar, diferentes estudios farmacológicos han mostrado que los antidepresivos monoaminérgicos tienen el potencial de prevenir o paliar las alteraciones en la expresión de receptores ionotrópicos y metabotrópicos de glutamato inducido por condiciones como la exposición crónica al estrés, atenuando el incremento en la señalización glutamatérgica. Concretamente, varios estudios señalan que el tratamiento reduciría la expresión de NMDA en pos de un aumento en la expresión de AMPA en la CPF. Además, aunque este efecto no se ha constatado a nivel cortical, los antidepresivos han mostrado aumentar la expresión de algunos receptores metabotrópicos de glutamato en el HPC (ver en Musazzi et al., 2013). Por otra parte, el tratamiento crónico antidepresivo ha mostrado inducir una serie de cambios en el sEC a nivel cortical, concretamente, los animales tratados con ISRSs muestran un aumento en la expresión de los receptores CB1 y CB2 así como una reducción en los niveles de 2-AG, pero no de AEA (Smaga et al., 2014; 2017b).

La síntesis de los datos experimentales obtenidos en el sEC y el sistema glutamatérgico parecen indicar que el tratamiento antidepresivo habría actuado sobre una serie de mecanismos que, según la evidencia empírica disponible, habrían tenido lugar durante la abstinencia alcohólica en nuestro modelo animal. Teniendo en cuenta el diseño experimental (figura 24), cabe suponer que los resultados obtenidos representan la convergencia de los efectos del tratamiento en la abstinencia y los que la recuperación del consumo de alcohol pudiera ejercer a lo largo de las 3 semanas de la evaluación. Además, es posible que algunos de estos efectos contribuyeran a explicar los distintos patrones de auto-administración de alcohol encontrados. No obstante, durante la re-exposición al alcohol, podrían haber tenido lugar otros cambios en los sistemas analizados que interfirieran en la detección de los efectos que los

antidepresivos hubieran ejercido, especialmente en los animales tratados con fluoxetina y reboxetina, que casi duplicaron sus niveles de consumo de alcohol. Por esta razón, futuros estudios deberán determinar cuáles de los efectos de los antidepresivos encontrados en este trabajo conferirían un marco de vulnerabilidad, hacia el consumo y cuáles obedecerían a una consecuencia del mismo.

La mayoría de estas alteraciones se corresponden con lo que se ha observado en estudios previos que contemplaban los efectos del tratamiento crónico antidepresivo sobre los diferentes componentes del sistema glutamatérgico (Musazzi et al., 2013) y el sEC (Smaga et al., 2014; 2017b) y podrían estar reflejando parte del efecto que los diferentes antidepresivos tendrían en común en lo que respecta a los sistemas analizados en este trabajo. Así, la reconfiguración de los receptores ionotrópicos de glutamato podría ser el resultado de la inhibición de un estado hiperglutamatérgico acontecido en la abstinencia alcohólica. Esto reflejaría el efecto paliativo del tratamiento antidepresivo observado en otras condiciones de sobreseñalización glutamatérgica y excitotoxicidad (Musazzi et al., 2013) similares a las que tendrían lugar en la abstinencia alcohólica.

En relación a esto, teniendo en cuenta que el tratamiento antidepresivo incrementaría los niveles de oleiletanolamida, el ligando endógeno de PPAR (Romero-Sanchiz et al., 2019; Song et al., 2018), es posible que los animales tratados con antidepresivos en nuestros estudios mostraran una regulación a la baja de este receptor, mientras que los animales tratados con vehículo podrían mostrar un aumento compensatorio ante una menor activación del mismo. De forma análoga, teniendo en cuenta que un aumento en la señal de 2-AG podría constituir un mecanismo neuroprotector frente a la abstinencia alcohólica (Sánchez-Marin et al., 2017), un aumento en la enzima de síntesis de 2-AG podría constituir un mecanismo adicional de compensación en los animales tratados con vehículo. No obstante, estos posibles efectos compensatorios deberían ser confirmados en estudios futuros.

Como se menciona anteriormente, nuestros datos indican un aumento muy acusado de los niveles de proteína y ARNm del receptor CB2 en los animales que fueron tratados con fluoxetina y que, además, muestran un aumento significativo de la auto-administración de alcohol en la abstinencia. Estos datos coinciden parcialmente con los obtenidos en otros estudios previos, que indican que el tratamiento crónico

con ISRSs induce un aumento en la expresión del receptor CB2 en la CPF (Smaga et al., 2017b). Este es posiblemente uno de los efectos más contundentes que hemos registrado, y que podría contribuir a explicar el patrón de consumo observado en los animales tratados con fluoxetina. En los últimos años, el receptor CB2 ha ganado un interés creciente por su participación en el TUA y en la depresión (Manzanares et al., 2018; Onaivi et al., 2008a; 2008b; 2006). Ortega-Álvaro y colaboradores emplearon ratones transgénicos para estudiar la implicación del receptor CB2 en el valor reforzante del alcohol, así, observaron que la delección de CB2 inducía una mayor predisposición al consumo (Ortega-Álvaro et al., 2015). Complementariamente, Al Mansouri y colaboradores observaron que la activación farmacológica de CB2 inducía una reducción en la preferencia y el consumo de alcohol en ratones, un efecto que se veía anulado por el tratamiento con un antagonista de este receptor (Al Mansouri et al., 2014). De hecho, posteriormente, Navarrete y colaboradores corroborarían estos datos y además encontrarían que este antagonismo produciría un incremento en el consumo de alcohol (Navarrete et al., 2018). En coherencia, Ishiguro y colaboradores habían registrado una reducción en la expresión génica de CB2 en animales que exhibían una mayor preferencia por el consumo de alcohol. No obstante, contrariamente a las observaciones del resto de estudios, también observaron que la activación farmacológica de este receptor acentuaba el aumento en el consumo de alcohol en animales que habían sido previamente expuestos a condiciones de estrés crónico, mientras que el antagonismo de CB2 prevenía dicho efecto (Ishiguro et al., 2007). Este efecto bidireccional de la activación de CB2 sobre el consumo de alcohol sería constatado posteriormente por otro estudio (Onaivi et al., 2008b) y podría indicar una participación dual de la actividad del receptor CB2, especialmente bajo condiciones en las que un estado afectivo negativo pudiera interferir en la motivación por el consumo. Teniendo en cuenta que los modelos animales de depresión mostrarían aumentos en los niveles de ARNm y de proteína de CB2 (Onaivi et al., 2006) que son semejantes a los que hemos encontrado, el aumento de este receptor podría reflejar una exacerbación del estado afectivo negativo derivado de la abstinencia en los animales que fueron tratados con fluoxetina, con el consiguiente aumento en la auto-administración de alcohol. Cabe mencionar que este efecto podría representar parcialmente el soporte neurobiológico de una sensibilización hacia los efectos del

alcohol inducida por el tratamiento con fluoxetina. No obstante, algunas modificaciones en el diseño experimental, como la implementación de una valoración del fenotipo ansioso/depresivo, podrían corroborar esta hipótesis en futuras investigaciones.

Nuestros resultados obtenidos en los componentes del sEC y el sistema glutamatérgico en el HPC dorsal revelan que el sEC se ha encontrado casi inalterado en los animales que recibieron reboxetina e incrementaron su consumo en comparación con los animales que recibieron vehículo. Por otro lado, la disminución en la expresión de las subunidades de los receptores ionotrópicos y del receptor mGlu5 de glutamato observada en los animales que recibieron reboxetina reflejaría una alteración en la señalización glutamatérgica que podría subyacer a la escalada en el consumo de alcohol de estos animales, sobre todo en una estructura especialmente vulnerable a los efectos crónicos del alcohol, como el HPC (ver en Alasmari et al., 2018). No obstante, la implicación que esta reconfiguración de receptores pudiera tener sobre la motivación por retomar el consumo de alcohol debería estudiarse en mayor profundidad. Desafortunadamente, en el presente trabajo no hemos podido analizar las alteraciones de los sistemas EC y glutamatérgico en el HPC que habrían tenido lugar bajo el tratamiento con fluoxetina o bupropion, algo que podría contribuir a describir el papel que estos sistemas tendrían en los efectos del tratamiento antidepresivo y sobre la recaída en el consumo de alcohol.

El sEC cumple una función moduladora de la señal glutamatérgica por medio de la transmisión retrógrada de sus dos principales ligandos endógenos (2-AG y AEA) (Howlett et al., 2002). Teniendo en cuenta que los animales tratados con antidepresivos (fluoxetina, reboxetina y bupropion) mostraron una reducción en la enzima de síntesis de 2-AG y una reducción en las subunidades de los receptores ionotrópicos de glutamato, es posible que los resultados obtenidos estén reflejando una alteración en la señal glutamatérgica relacionada con una disminución en la función reguladora mediada por la señal de 2-AG en la CPF. De hecho, un estudio reciente indica que el tratamiento con fluoxetina podría inducir una alteración en la activación de los receptores glutamatérgicos acompañada de una disminución de los niveles de 2AG en la amígdala de los animales que, a su vez, mostraron un aumento en el consumo de alcohol en la recaída similar al que hemos encontrado en nuestro

trabajo (Suárez et al., 2019 *in press*). Según los datos que hemos obtenido, algo semejante podría darse en los animales tratados con los 3 antidepresivos empleados, aunque, en conjunto con los cambios específicos encontrados en los animales tratados con fluoxetina y reboxetina, es probable que este efecto contribuyera a explicar el hecho de que los animales tratados con estos antidepresivos aumentaran el consumo de alcohol en la recaída, a diferencia de lo que se observó en los que recibieron bupropion. No obstante, esta cuestión debería confirmarse en futuros estudios.

En conjunto, los datos obtenidos sobre los receptores y enzimas del sEC y el sistema glutamatérgico mostrarían que los 3 antidepresivos (fluoxetina, bupropion y reboxetina) podrían haber tenido efectos comunes en estos sistemas durante la abstinencia alcohólica en nuestros animales de experimentación. Además, es posible que los datos obtenidos representen una interacción entre los efectos del tratamiento y re-exposición al alcohol. Algunos cambios específicos encontrados en los animales tratados con fluoxetina (relativos al receptor CB2) y reboxetina (relativos a las alteraciones de los receptores glutamatérgicos en el HPC), podrían subyacer a los efectos que el tratamiento subcrónico habría inducido sobre el consumo de alcohol de estos animales en la recaída.

Los Sistemas EC y glutamatérgico se encuentran estrechamente vinculados con los procesos de neurogénesis del HPC (Balu y Lucki 2009; Zimmermann et al., 2018; Scarante et al., 2017), por lo que los efectos del tratamiento antidepresivo sobre estos sistemas en el HPC podrían tener una repercusión considerable sobre los eventos neurogénicos que podrían acontecer durante la recaída en el consumo. En este sentido, la aproximación preclínica hacia este fenómeno de neuroplasticidad supondría una contribución importante en la comprensión del ciclo adictivo, así como de los mecanismos que subyacen al efecto terapéutico de los tratamientos antidepresivos que fueran más indicados en pacientes con TUA. Así, el tercer objetivo principal de este trabajo consiste en una recopilación de evidencia preclínica y clínica con el fin de conocer el estado actual de esta cuestión y abrir nuevas perspectivas de investigación.

La depresión y el TUA presentarían alteraciones comunes en distintos procesos de neuroplasticidad y neurogénesis (Renoir et al., 2012; Chambers, 2013). Precisamente, la neurogénesis adulta en el HPC es tal vez el fenómeno que mayor atracción y controversia ha generado en este campo en los últimos años (Boldrini et

al., 2018; Kempermann et al., 2018; Snyder, 2019). Existen evidencias del impacto que el TUA y la abstinencia alcohólica pueden suponer para la neurogénesis en el HPC tanto en humanos como en animales (ver Olsufka et al., 2018; Le Maître et al., 2018), así como de una posible implicación de estos mecanismos en la recaída. Concretamente, los autores sugieren que la preservación de los procesos de neurogénesis en el HPC podría contribuir a la recuperación, mientras que alteraciones en el mismo podría conformar un marco de vulnerabilidad para la recaída en el consumo (Mandyam y Koob, 2012).

Por otro lado, el tratamiento antidepresivo tendría el potencial para prevenir el deterioro neurogénico y las repercusiones afectivas presentes en el contexto de la abstinencia alcohólica (Stevenson et al., 2009), que podrían estar indirectamente relacionados con la recaída en el consumo de alcohol. No obstante, el trabajo de revisión realizado no nos ha permitido encontrar evidencias sobre la repercusión que el efecto neurogénico del tratamiento antidepresivo tendría sobre la recaída en el consumo.

A este respecto, los resultados del estudio de Somkuwar et al., 2016 ofrecen una aproximación a la posible implicación de los procesos de neurogénesis del HPC en la abstinencia y en la recaída en el consumo de alcohol. Los autores señalan que los animales que exhibieron un aumento en el consumo de alcohol tras la abstinencia también presentaban un característico efecto rebote en los parámetros de neurogénesis del HPC, es decir, un aumento temprano en la proliferación seguido de una disminución de marcadores de maduración y supervivencia neural en etapas avanzadas de la abstinencia alcohólica. En relación a estos datos, los mismos autores han observado que un patrón de neurogénesis aberrante durante la abstinencia de metanfetamina podría constituir un factor que precipitaría la recaída en el consumo (Galinato et al., 2018; Mandyam et al., 2018).

En conjunto, estos datos parecen indicar que durante la abstinencia podrían acontecer una serie de mecanismos neurogénicos específicos que, si bien podrían responder a un efecto compensatorio, también podrían, en parte, contribuir a consolidar el ciclo adictivo, promoviendo la recaída en el consumo. En este contexto, resultaría interesante analizar el efecto neurogénico que el tratamiento antidepresivo

ejerciera durante la abstinencia alcohólica, así como las repercusiones este efecto sobre la motivación por recuperar el consumo de alcohol.

En lo que a la evidencia clínica respecta, por un lado, algunos estudios muestran que la fluoxetina reduciría eficazmente la recaída en el consumo de alcohol (Naranjo et al., 1994; Janiri et al., 1996), así como la sintomatología depresiva y el consumo de alcohol en pacientes comórbidos con un TUA leve o moderado (descritos como tipo A/I) (Cornelius et al., 1997; 2000). No obstante, ante la presencia de importantes limitaciones en el tamaño y la representatividad de la muestra, estos resultados deben interpretarse con cautela. Contrariamente, otros resultados indicarían que, en pacientes con una mayor severidad del TUA (descritos como tipo B/II), el tratamiento con fluoxetina daba lugar a peores índices de abstinencia y aumentos en el consumo de alcohol (Kranzler et al., 1996). Aunque la fluoxetina es posiblemente el más utilizado de entre los antidepresivos disponibles en la práctica clínica, otros, como la sertralina o el citalopram serían, dentro de la familia de los ISRSs, los que más se ha utilizado en los ensayos clínicos en pacientes con TUA y depresión (ver Agabio et al., 2018). No obstante, teniendo en cuenta el perfil farmacológico de ambos fármacos, cabría esperar que mostraran efectos similares sobre el curso del TUA. Como se menciona en la introducción, la eficacia clínica de esta gran familia de antidepresivos es posiblemente la más contradictoria. Así, los ensayos que han empleado ISRSs muestran, entre otros resultados, aumentos en el número de episodios de consumo elevado (Charney et al., 2015; Dundon et al., 2004), mayores tasas de recaída (Chick et al., 2004), así como una tendencia a un peor curso del TUA (Pettinati et al., 2000), especialmente en pacientes con TUA que tenderían a una mayor severidad (descritos como tipo B/II). Por otro lado, el meta-análisis de Foulds et al., 2015a indicaría que la depresión (inducida o independiente) no repercutiría significativamente en la (escasa) respuesta al tratamiento con ISRSs, si bien los autores también indicaban que los pacientes con depresión inducida por el alcohol podrían mostrar una mejor respuesta temprana al tratamiento (Foulds et al., 2015b). No obstante, el número de ensayos incluidos en esta comparación es muy reducido y teniendo en cuenta que la depresión comórbida sería más frecuente en pacientes con mayor severidad del TUA (Babor et al., 1992 Ehlers et al., 2019; Tam et al., 2014), esta cuestión debería ser abordada en mayor profundidad a la hora de considerar la

elección del antidepresivo en un TUA severo. La inconsistente evidencia clínica de los ISRSs en el TUA que se obtiene por medio de los ensayos clínicos viene acompañada por otros estudios que aportan datos lo suficientemente preocupantes como para ser señalados en este trabajo. Así, una recopilación de casos sugeriría que el tratamiento con ISRSs podría estar relacionado con un incremento en el número de episodios de intoxicación alcohólica (Menkes y Herxheimer, 2014). Esto podría guardar relación con la aparición de casos de TUA en pacientes bajo tratamiento con ISRSs (Atigari et al., 2014; Brookwell et al., 2014). Actualmente no hemos encontrado datos clínicos sobre la eficacia del bupropion o la reboxetina en pacientes con TUA. Esto es algo que, en el caso del bupropion, resulta especialmente sorprendente teniendo en cuenta la extensa literatura disponible sobre su eficacia en el tabaquismo (Richmond y Zwar, 2003), más aún cuando existen precedentes, como la vareniclina (antagonista de $nACh \alpha 4\beta 2$), de que el tratamiento efectivo para reducir el consumo de tabaco también beneficiaría a los pacientes con TUA (Ray et al., 2018). Tenemos conocimiento de que al menos un ensayo en fase II con bupropion se está llevando a cabo por la universidad de Carolina del Norte (ver en Navarro et al., 2019). A diferencia de lo observado en los ISRSs, los reportes de casos en los que el tratamiento con bupropion tuviera consecuencias negativas sobre aspectos relacionados con el consumo de alcohol parecen ser menos frecuentes (Chandler y Herxheimer, 2011; Ramcharitar et al., 1992), si bien su potencial adictivo a altas dosis debiera ser tenido en cuenta (Reeves y Ladner, 2013). Así, por muy prometedores que pudieran parecer los escasos indicios, la eficacia del bupropion deberá ser contrastada por lo ensayos clínicos y modelos animales que traten de reflejar con la mayor fidelidad posible las condiciones de estos pacientes.

En conjunto, estos datos sugerirían que la severidad del TUA (independientemente del tipo de depresión comórbida) podría ser un factor a tener en cuenta a la hora de evitar los posibles efectos negativos que la fluoxetina y otros ISRSs pudieran ejercer sobre el consumo de alcohol en pacientes comórbidos. Concretamente, el uso de ISRSs podría no solo no beneficiar a estos pacientes, sino que además, la evidencia clínica mostraría indicios de que, bajo determinadas condiciones, el tratamiento podría tener repercusiones negativas sobre el curso del TUA, algo que nuestros datos podrían estar reflejando. Por otro lado, aunque se

desconoce con exactitud el impacto clínico que el uso de antidepresivos de la familia de los ISRN pudiera tener sobre el curso del TUA, los datos que hemos obtenido en el presente trabajo podrían servir para contemplar con precaución la posibilidad de que los pacientes vulnerables incidieran en un consumo elevado de alcohol a consecuencia de los posibles efectos de este tratamiento. Finalmente, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo, el bupropion podría tener un potencial terapéutico en el TUA como un antidepresivo carente de las repercusiones negativas que mostrarían los antidepresivos con un perfil distinto (ISRS e ISRN), si bien estaríamos dando los primeros pasos en la constatación de su eficacia.

Limitaciones

Debido a que el presente trabajo tenía como objetivo principal analizar las consecuencias del tratamiento antidepresivo sobre la conducta de auto-administración de alcohol (siendo este uno de los puntos más controvertidos en base a la literatura disponible), otros aspectos relevantes, como las implicaciones a nivel neurobiológico de estos tratamientos, no han podido ser analizados en profundidad, aunque consideramos que una pequeña aproximación preliminar constituye una aportación valiosa ante la escasa evidencia disponible sobre las variables neurobiológicas que subyacen a los efectos del tratamiento antidepresivo en pacientes con TUA.

La ausencia de un grupo de animales que no fueran expuestos a la auto-administración de alcohol presenta una traba a la hora de interpretar los datos obtenidos en los diferentes parámetros biológicos analizados. Así, la interpretación de estos resultados trata de complementarse con los datos que otros estudios han obtenido en modelos animales de exposición crónica y abstinencia de alcohol, en los que las observaciones en el sEC y el sistema glutamatérgico difieren de un grupo control. En segundo lugar, la obtención de muestras se limita a una sola evaluación que corresponde al final de un largo período en el que se han sucedido los diferentes estadios del ciclo adictivo así como al periodo de tratamiento subcrónico antidepresivo. Teniendo en cuenta la complejidad de los mecanismos de neuroadaptación que se suceden a lo largo de estos eventos, la evaluación de

muestras biológicas en diferentes puntos del diseño experimental sería muy reveladora de cara a conocer la implicación de los sistemas analizados en el ciclo adictivo y el tratamiento antidepresivo. No obstante, también tenemos en cuenta la complejidad en el diseño experimental y el elevado número de animales que requeriría el estudio exhaustivo y longitudinal de este efecto.

Perspectivas futuras

La valoración preclínica de los tratamientos farmacológicos en pacientes con TUA tiene por delante aún un largo recorrido. Concretamente, la validación del tratamiento antidepresivo en estos pacientes requiere de una consideración especial, habida cuenta de la inconcluyente literatura disponible sobre su efectividad y de los resultados obtenidos recientemente en modelos animales, tales como los presentados en este trabajo.

De esta forma, pensamos que futuros estudios deberían contemplar posibles efectos dependientes de la dosis del antidepresivo utilizado, así como realizar una valoración del consumo de alcohol bajo paradigmas complementarios a la auto-administración operante, como los protocolos de libre elección, que contribuirían a generalizar los efectos del tratamiento antidepresivo sobre el consumo de alcohol que hemos registrado en nuestros estudios, incorporando, por ejemplo, información relativa a posibles cambios en la preferencia por el consumo de alcohol en los animales a consecuencia del tratamiento antidepresivo. Además, la implementación de una cohorte de animales destinada a la valoración del fenotipo ansioso-depresivo previa re-exposición al consumo de alcohol arrojaría la información crucial sobre la eficacia de los antidepresivos de la que carecen la mayoría de los estudios preclínicos.

Por otro lado, el conocimiento sobre las bases neurobiológicas que subyacen a los efectos de los antidepresivos en estos pacientes es muy limitada. En este sentido, futuros estudios podrían determinar cuáles serían los factores neurobiológicos que tendrían lugar como consecuencia de la auto-administración crónica de alcohol en la abstinencia, así como del tratamiento subcrónico antidepresivo, y que finalmente subyacen a la vulnerabilidad y/o protección ante el consumo de alcohol en el contexto de la recaída. Además, estos análisis podrían incluir la evaluación de otras estructuras

relacionadas con los distintos estadios del ciclo adictivo (**figura 7**), como el HPC, la amígdala, el ATV o el NAc, que contribuiría a profundizar en el papel que estos sistemas desempeñarían en el efecto terapéutico antidepresivo y en la recaída en el consumo.

Finalmente, dado que la eficacia del tratamiento antidepresivo se sustenta sobre múltiples procesos de neuroplasticidad, que abarcan desde mecanismos de neuromodulación en los diferentes sistemas de neurotransmisión hasta la proliferación e integración funcional de nuevas neuronas, sería especialmente interesante evaluar la implicación de los eventos de neurogénesis en el HPC que tienen lugar durante la abstinencia alcohólica sobre el consumo de alcohol, así como el papel que desempeñara el tratamiento antidepresivo sobre los mismos.

9. CONCLUSIONES

La consecución de los objetivos de este trabajo nos lleva a extraer las siguientes conclusiones:

- 1.** El tratamiento subcrónico (14 días) con antidepresivos de diferente mecanismo de acción durante la abstinencia induce patrones específicos en la conducta de auto-administración de alcohol en un modelo animal basado en el ADE. Así:
 - a.** El tratamiento subcrónico con fluoxetina (ISRS) induce un aumento en la conducta de auto-administración de alcohol que se mantiene a lo largo de las 3 semanas de la evaluación de la recaída en el consumo.
 - b.** El tratamiento subcrónico con bupropion (IRDN) no altera de forma significativa la conducta de auto-administración de alcohol a lo largo de las 3 semanas de la evaluación de la recaída en el consumo.
 - c.** El tratamiento subcrónico con reboxetina (ISRN) induce un aumento en la conducta de auto-administración de alcohol que refleja una escalada en el consumo a lo largo de las 3 semanas de la evaluación de la recaída en el consumo.

- 2.** Los animales que recibieron tratamiento antidepresivo y mostraron los distintos patrones de consumo en la recaída presentan alteraciones en los niveles de ARNm y de densidad de proteína de los sistemas EC y glutamatérgico en la CPF y el HPC en comparación con los animales que recibieron vehículo. Así:
 - a.** Los animales que recibieron tratamiento subcrónico antidepresivo (fluoxetina, bupropion y reboxetina) muestran una reducción en la expresión de las subunidades N1 y A1 de los receptores NMDA y AMPA, así como una disminución de la enzima DAGL en la CPF.
 - b.** Los animales que recibieron tratamiento con fluoxetina muestran un marcado aumento del receptor CB2 en la CPF.
 - c.** Los animales que recibieron tratamiento subcrónico con bupropion y reboxetina, mostraron una reducción de los receptores mGlu5 y CB1, así como de la enzima MAGL en la CPF.

d. En el HPC dorsal, los animales que recibieron tratamiento con reboxetina muestran una disminución de las subunidades N1 y A1 de los receptores NMDA y AMPA así como del receptor mGlu5 y la enzima DAGL.

3. Los resultados obtenidos en los niveles de ARNm y densidad de proteína indican que los animales tratados con antidepresivos (Fluoxetina, bupropion y reboxetina) reflejarían un estado de excitabilidad glutamatérgica acompañado de una desactivación del sEC y de su función moduladora de la neurotransmisión. Esto podría implicar alteraciones en diferentes procesos de neuroplasticidad, y, en este sentido, el estudio de la neurogénesis en el HPC constituiría una importante fuente de investigación de cara a la realización de futuros estudios.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abbing-Karahagopian V, Huerta C, Souverein PC, de Abajo F, Leufkens HGM, Slattery J, Miret M, Gil M, Oliva B, Hesse U, Requena G, de Vries F, Rottenkolber M, Schmiedl S, Reynolds R, Schlienger RG, de Groot MC, Klungel OH, van Staa TP, van Dijk L, Egberts AC, Gardarsdottir H, De Bruin ML (2014) Antidepressant prescribing in five European countries: Application of common definitions to assess the prevalence, clinical observations, and methodological implications. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 70(7): 849-857.
- Abraham WC (2008) Metaplasticity: tuning synapses and networks for plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 9: 387–399.
- Agabio R, Trogu E, Pani PP (2018) Antidepressants for the treatment of people with co-occurring depression and alcohol dependence. *Cochrane Database Syst Rev*. 4:CD008581.
- Agarwal DP, Goedde HW (1989) Human aldehyde dehydrogenases: their role in alcoholism. *Alcohol*. 6:517–523.
- Al Mansouri S, Ojha S, Al Maamari E, Al Ameri M, Nurulain SM, Bahi A (2014) The cannabinoid receptor 2 agonist, beta-caryophyllene, reduced voluntary alcohol intake and attenuated ethanol-induced place preference and sensitivity in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 124: 260-268.
- Alasmari F, Goodwani S, McCullumsmith RE, Sari Y (2018) Role of glutamatergic system and mesocorticolimbic circuits in alcohol dependence. *Prog Neurobiol.* 171: 32-49.
- Alén F, Marban T, Ballesta A, Antón M, Ramirez-Lopez MT, Blanco N, Ouco D, Jaimez-Alameda M, Gomez de Heras R, Serrano A, Gorriti MA, Suárez J, Rodriguez de Fonseca F (2016) Acute administration of reboxetine reduces alcohol self-administration but, after a subchronic treatment with this drug, alcohol self-administration is enhanced. *European Psychiatry*. 33 Supplement: 410-411.
- Alén F, Moreno-Sanz G, Isabel de Tena A, Brooks RD, López-Jimenez A, Navarro M, López-Moreno JA (2008) Pharmacological activation of CB1 and D2 receptors in rats: predominant role of CB1 in the increase of alcohol relapse. *Eur J Neurosci.* 27(12): 3292-8.

- Alén F, Orio L, Gorriti MÁ, de Heras RG, Ramírez-López MT, Pozo MÁ, de Fonseca FR (2013) Increased alcohol consumption in rats after subchronic antidepressant treatment. *Int J Neuropsychopharmacol*. 16(8): 1809-18.
- Alén F, Serrano A, Gorriti MÁ, Pavón FJ, Orio L, de Heras RG, Ramírez-López MT, Antón M, Pozo MÁ, Rodríguez de Fonseca F (2014) The administration of atomoxetine during alcohol deprivation induces a time-limited increase in alcohol consumption after relapse. *Int J Neuropsychopharmacol*. 17(11): 1905-10.
- Al-Harbi KS (2012) Treatment-resistant depression: therapeutic trends, challenges, and future directions. *Patient Prefer Adherence*. 6: 369–388.
- Allen E (1912) The cessation of the mitosis in the central nervous system of the albino rat. *J Comp Neurol*. 22: 547–568.
- Altman J, Das GD (1965a) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol*. 124(3): 319-35.
- Altman J, Das GD (1965b) Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature*. 207(5000): 953-6.
- American Psychiatric Association (APA) (2014) Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (5.th ed. [DSM-5]). Editorial Médica Panamericana. Madrid.
- Andreoli V, Caillard V, Deo RS, Rybakowski JK, Versiani M (2002) Reboxetine, a new noradrenaline selective antidepressant, is at least as effective as fluoxetine in the treatment of depression. *J Clin Psychopharmacol*. 22(4): 393-9.
- Angehagen M, Rönnbäck L, Hansson E, Ben-Menachem E (2005) Topiramate reduces AMPA-induced Ca(2+) transients and inhibits GluR1 subunit phosphorylation in astrocytes from primary cultures. *J Neurochem*. 94(4): 1124-30.
- Antón M, Alén F, Gomez De Heras R, Serrano A, Pavón FJ, Leza JC, García-Bueno B, Rodríguez de Fonseca F, Orio L (2017) Oleoylethanolamide prevents neuroimmune HMGB1/TLR4/NF-κB danger signaling in rat frontal cortex and depressive-like behavior induced by ethanol binge administration. *Addict. Biol*. 22: 724–741.

- Antonelli M, Ferrulli A, Sestito L, Vassallo GA, Tarli C, Mosoni C, Rando MM, Mirijello A, Gasbarrini A, Addolorato G (2018) Alcohol addiction - the safety of available approved treatment options. *Expert Opin Drug Saf.* 17(2): 169-177.
- Araque A, Castillo PE, Manzoni OJ, Tonini R (2017) Synaptic functions of endocannabinoid signaling in health and disease. *Neuropharmacology.* 124: 13–24.
- Atigari OV, Kelly AM, Jabeen Q, Healy D (2013) New onset alcohol dependence linked to treatment with selective serotonin reuptake inhibitors. *The International Journal of Risk & Safety in Medicine.* 25: 105-109.
- Auclair N, Otani S, Soubrie P, Crepel F (2000) Cannabinoids modulate synaptic strength and plasticity at glutamatergic synapses of rat prefrontal cortex pyramidal neurons. *J Neurophysiol.* 83(6): 3287-93.
- Babor TF, Hofmann M, DelBoca FK, Hesselbrock V, Meyer RE, Dolinsky ZS, Rounsaville B (1992) Types of alcoholics, I. Evidence for an empirically derived typology based on indicators of vulnerability and severity. *Arch Gen Psychiatry.* 49(8): 599-608.
- Baez MV, Cercato MC, Jerusalinsky DA (2018) NMDA Receptor Subunits Change after Synaptic Plasticity Induction and Learning and Memory Acquisition. *Neural Plast.* 5093048.
- Balu DT, Lucki I (2009) Adult hippocampal neurogenesis: regulation, functional implications, and contribution to disease pathology. *Neurosci Biobehav Rev.* 33(3): 232–252.
- Bang-Andersen B, Ruhland T, Jørgensen M, Smith G, Frederiksen K, Jensen KG, Zhong H, Nielsen SM, Hogg S, Mørk A, Stensbøl TB (2011) Discovery of 1-[2-(2,4 dimethylphenylsulfanyl) phenyl]piperazine (Lu AA21004): a novel multimodal compound for the treatment of major depressive disorder. *J Med Chem.* 54(9): 3206-21.
- Barajaz AM, Kliethermes CL (2017) An assessment of the utilization of the preclinical rodent model literature in clinical trials of putative therapeutics for the treatment of alcohol use disorders. *Drug and Alcohol Dependence.* 181: 77-84.
- Bauer J, Pedersen A, Scherbaum N, Bening J, Patschke J, Kugel H, Heindel W, Arolt V, Ohrmann P (2013) Craving in alcohol-dependent patients after detoxification

- is related to glutamatergic dysfunction in the nucleus accumbens and the anterior cingulate cortex. *Neuropsychopharmacology*. 38(8): 1401–1408.
- Bell RL, Hauser SR, Liang T, Sari Y, Maldonado-Devinci A, Rodd ZA (2017) Rat animal models for screening medications to treat alcohol use disorders. *Neuropharmacology*. 122: 201–243.
- Belmer A, Patkar OL, Pitman KM, Bartlett SE (2016) Serotonergic Neuroplasticity in Alcohol Addiction. *Brain plasticity. Amsterdam, Netherlands*. 1(2): 177-206.
- Berman RM, Cappiello A, Anand A, Oren DA, Heninger GR, Charney DS, Krystal JH (2000) Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biological Psychiatry*. 47: 351–354.
- Bessa JM, Ferreira D, Melo I, Marques F, Cerqueira JJ, Palha JA, Almeida OF, Sousa N (2009) The mood-improving actions of antidepressants do not depend on neurogenesis but are associated with neuronal remodeling. *Mol Psychiatry*. 14: 764-773.
- Biggio G (2015) Neurobiology of alcohol and pharmacological aspects of nalmefene. *Riv Psichiatr*. 50: 19–27.
- Bilbao A, Serrano A, Cippitelli A, Pavón FJ, Giuffrida A, Suárez J, García-Marchena N, Baixeras E, Gómez de Heras R, Orio L, Alén F, Ciccocioppo R, Cravatt BF, Parsons LH, Piomelli D, Rodríguez de Fonseca F (2016) Role of the satiety factor oleoylethanolamide in alcoholism. *Addict Biol*. 21(4): 859–872.
- Biscoe TJ, Evans RH, Francis AA, Martin MR, Watkins JC, Davies J, Dray A (1977) D-alpha-Aminoadipate as a selective antagonist of amino acid-induced and synaptic excitation of mammalian spinal neurones. *Nature*. 270(5639): 743-5.
- Bisogno T, Howell F, Williams G, Minassi A, Cascio MG, Ligresti A, Matias I, Schiano-Moriello A, Paul P, Williams EJ, Gangadharan U, Hobbs C, Di Marzo V, Doherty P (2003) Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J Cell Biol*. 163(3): 463-8.
- Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. 361(6407):31-9.
- Bobula B, Tokarski K, Hess G (2003) Repeated administration of antidepressants decreases field potentials in rat frontal cortex. *Neuroscience*. 120: 765-769.

- Boden JM, Fergusson DM (2011) Alcohol and depression. *Addiction*. 106(5): 906-14.
- Boldrini M, Butt TH, Santiago AN, Tamir H, Dwork AJ, Rosoklija GB, Arango V, Hen R, Mann JJ (2014) Benzodiazepines and the potential trophic effect of antidepressants on dentate gyrus cells in mood disorders. *Int J Neuropsychopharmacol*. 17(12): 1923–1933.
- Boldrini M, Fulmore CA, Tartt AN, Simeon LR, Pavlova I, Poposka V, Rosoklija GB, Stankov A, Arango V, Dwork AJ, Hen R, Mann JJ (2018) Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. *Cell Stem Cell*. 22(4):589–599.e5.
- Boldrini M, Hen R, Underwood MD, Rosoklija GB, Dwork AJ, Mann JJ, Arango V (2012) Hippocampal angiogenesis and progenitor cell proliferation are increased with antidepressant use in major depression. *Biol Psychiatry*. 72(7): 562–571.
- Boldrini M, Santiago AN, Hen R, Dwork AJ, Rosoklija GB, Tamir H, Arango V, John Mann J (2013) Hippocampal granule neuron number and dentate gyrus volume in antidepressant-treated and untreated major depression. *Neuropsychopharmacology*. 38(6): 1068–1077.
- Boldrini M, Underwood MD, Hen R, Rosoklija GB, Dwork AJ, John Mann J, Arango V (2009) Antidepressants increase neural progenitor cells in the human hippocampus. *Neuropsychopharmacology*. 34(11): 2376–2389.
- Bolton JM, Robinson J, Sareen J (2009) Self-medication of mood disorders with alcohol and drugs in the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. *J Affect Disord*. 115(3): 367-75.
- Bonanno G, Giambelli R, Raiteri L, Tiraboschi E, Zappettini S, Musazzi L, Raiteri M, Racagni G, Popoli M (2005) Chronic antidepressants reduce depolarization-evoked glutamate release and protein interactions favoring formation of SNARE complex in hippocampus. *J Neurosci*, 25: 3270-3279.
- Boschloo L, Vogelzangs N, Smit JH, Van der Brink W, Veltman DJ, Beekman AT, Penninx BW (2011) Comorbidity and risk indicators for alcohol use disorders among persons with anxiety and/or depressive disorders: findings from the Netherlands Study of Depression and Anxiety (NESDA). *J Affect Disord*. 131: 233–242.
- Boschloo L, Vogelzangs N, van den Brink W, Smit JH, Beekman ATF, Penninx BWJH (2012b) The role of negative emotionality and impulsivity in

- depressive/anxiety disorders and alcohol dependence. *Psychological Medicine*. 43(6): 1241–1253.
- Boschloo L, Vogelzangs N, van den Brink W, Smit JH, Veltman DJ, Beekman AT, Penninx BW (2013) Depressive and anxiety disorders predicting first incidence of alcohol use disorders: results of the Netherlands Study of Depression and Anxiety (NESDA). *J Clin Psychiatry*. 74(12): 1233-40.
- Boschloo L, Vogelzangs N, van den Brink W, Smit JH, Veltman DJ, Beekman AT, Penninx BW (2012a) Alcohol use disorders and the course of depressive and anxiety disorders. *Br J Psychiatry*. 200(6): 476-84.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 72 (1–2): 248–54-
- Brennan PL, SooHoo S, Lemke S, Schutte KK (2016) Alcohol Use Predicts 10-Year Depressive Symptom Trajectories in the Health and Retirement Study. *J Aging Health*. 28(5): 911-32.
- Briones TL, Woods J (2013) Chronic binge-like alcohol consumption in adolescence causes depression-like symptoms possibly mediated by the effects of BDNF on neurogenesis. *Neuroscience*. 254: 324-334.
- Brookwell L, Hogana C, Healya D, Manginb D (2014) Ninety-three cases of alcohol dependence following SSRI treatment. *The International Journal of Risk & Safety in Medicine*. 26: 99-107.
- Brown RA, Ramsey SE, Kahler CW, Palm KM, Monti PM, Abrams D, Dubreuil M, Gordon A, Miller IW (2011) A randomized controlled trial of cognitive-behavioral treatment for depression versus relaxation training for alcohol-dependent individuals with elevated depressive symptoms . *J Stud Alcohol Drugs*. 72 (2): 286.
- Brückner MK, Rossner S, Arendt T (1997) Differential changes in the expression of AMPA receptors genes in rat brain after chronic exposure to ethanol: an in situ hybridization study. *J Hirnforsch*. 38(3): 369-76.
- Budzyńska B, Biała G (2011) Effects of bupropion on the reinstatement of nicotine-induced conditioned place preference by drug priming in rats. *Pharmacol Rep*. 63(2): 362-71.

- Butelman ER, Kreek MJ (2017) Medications for substance use disorders (SUD): emerging approaches. *Expert Opin Emerg Drugs*. 22(4): 301-315.
- Bymaster FP, Dreshfield-Ahmad LJ, Threlkeld PG, Shaw JL, Thompson L, Nelson DL, Hemrick-Luecke SK, Wong DT (2001) Comparative affinity of duloxetine and venlafaxine for serotonin and norepinephrine transporters in vitro and in vivo, human serotonin receptor subtypes, and other neuronal receptors. *Neuropsychopharmacology*. 25(6): 871-80.
- Bymaster FP, Katner JS, Nelson DL, Hemrick-Luecke SK, Threlkeld PG, Heiligenstein JH, Morin SM, Gehlert DR, Perry KW (2002) Atomoxetine increases extracellular levels of norepinephrine and dopamine in prefrontal cortex of rat: a potential mechanism for efficacy in attention deficit/hyperactivity disorder. *Neuropsychopharmacology*. 27(5): 699-711.
- Cannady R, Fisher KR, Durant B, Besheer J, Hodge CW (2013) Enhanced AMPA receptor activity increases operant alcohol self-administration and cue-induced reinstatement. *Addict Biol*. 18(1): 54–65.
- Castrén E, Hen R (2013) Neuronal plasticity and antidepressant actions. *Trends Neurosci*. 36(5): 259–267.
- Ceccarini J, Hompes T, Verhaeghen A, Casteels C, Peuskens H, Bormans G, Claes S, Van Laere K (2014) Changes in cerebral CB1 receptor availability after acute and chronic alcohol abuse and monitored abstinence. *J Neurosci*. 34(8): 2822-31.
- Cederbaum AI (2012) Alcohol metabolism. *Clin Liver Dis*. 16 (4): 667-685.
- Chambers RA (2013) Adult hippocampal neurogenesis in the pathogenesis of addiction and dual diagnosis disorders. *Drug and Alcohol Dependence*. 130 (1-3): 1-12.
- Chandler P, Herxheimer A (2011) Unexpected aggressive behaviour: interaction of bupropion and alcohol. *Int J Risk Saf Med*. 23(3): 133-7.
- Charney DA, Heath LM, Zikos E, Palacios-Boix J, Gill KJ (2015) Poorer drinking outcomes with citalopram treatment for alcohol dependence: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*. 39(9): 1756-1765.
- Charney DS (1998) Monoamine dysfunction and the pathophysiology and treatment of depression. *J Clin Psychiatr*. 59 (14):11-4.

- Cheer JF, Wassum KM, Sombers LA, Heien ML, Ariansen JL, Aragona BJ, Phillips PE, Wightman RM (2007) Phasic dopamine release evoked by abused substances requires cannabinoid receptor activation. *J Neurosci.* 27(4): 791-5.
- Chen W, Nong Z, Li Y, Huang J, Chen C, Huang L (2017) Role of Dopamine Signaling in Drug Addiction. *Curr Top Med Chem.* 17(21):2440-2455.
- Chick J, Aschauer H, Hornik K (2004) Efficacy of fluvoxamine in preventing relapse in alcohol dependence: A one-year, double-blind, placebo-controlled multicentre study with analysis by typology. *Drug and Alcohol Dependence.* 74(1): 61-70.
- Choi DW (1992) Excitotoxic cell death. *J Neurobiol.* 23(9): 1261-76.
- Christensen R, Kristensen PK, Bartels EM, Bliddal H, Astrup A (2007) Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant: a meta-analysis of randomised trials. *Lancet.* 370 : 1706-1713.
- Cippitelli A, Bilbao A, Hansson AC, del Arco I, Sommer W, Heilig M, Massi M, Bermúdez-Silva FJ, Navarro M, Ciccocioppo R, de Fonseca FR, European TARGALC Consortium (2005) Cannabinoid CB1 receptor antagonism reduces conditioned reinstatement of ethanol-seeking behavior in rats. *Eur J Neurosci.* 21(8): 2243-51.
- Cippitelli A, Cannella N, Braconi S, Duranti A, Tontini A, Bilbao A, Defonseca FR, Piomelli D, Ciccocioppo R (2008) Increase of brain endocannabinoid anandamide levels by FAAH inhibition and alcohol abuse behaviours in the rat. *Psychopharmacology (Berl).* 198(4): 449-60.
- Cohen G, Sinet PM, Heikkila R (1980) Ethanol oxidation by rat brain in vivo. *Alcohol Clin Exp Res.* 4(4):366-70.
- Colle R, de Larminat D, Rotenberg S, Hozer F, Hardy P, Verstuyft C, Fève B, Corruble E (2017) PPAR- γ Agonists for the Treatment of Major Depression: A Review. *Pharmacopsychiatry.* 50(2): 49-55.
- Cornelius JR, Chung TA, Douaihy AB, Kirisci L, Glance J, Kmiec J, Wesesky MA, FitzGerald D, Salloum I (2016) A Review of the Literature of Mirtazapine in Co-Occurring Depression and an Alcohol Use Disorder. *J Addict Behav Ther Rehabil.* 5(4): 159.

- Cornelius JR, Salloum IM, Ehler JG, Jarrett PJ, Cornelius MD, Perel JM, Thase ME, Black A (1997) Fluoxetine in depressed alcoholics. A double-blind, placebo-controlled trial. *Arch Gen Psychiatry*. 54(8): 700-5.
- Cornelius JR, Salloum IM, Haskett RF, Daley DC, Cornelius MD, Thase ME, Perel JM (2000) Fluoxetine versus placebo in depressed alcoholics: a 1-year follow-up study. *Addict Behav*. 25(2): 307-10.
- Cramer SC, Sur M, Dobkin BH, O'Brien C, Sanger TD, Trojanowski JQ, Rumsey JM, Hicks R, Cameron J, Chen D, Chen WG, Cohen LG, deCharms C, Duffy CJ, Eden GF, Fetz EE, Filart R, Freund M, Grant SJ, Haber S, Kalivas PW, Kolb B, Kramer AF, Lynch M, Mayberg HS, McQuillen PS, Nitkin R, Pascual-Leone A, Reuter-Lorenz P, Schiff N, Sharma A, Shekim L, Stryker M, Sullivan EV, Vinogradov S (2011) Harnessing neuroplasticity for clinical applications. *Brain*. 134(6): 1591-609.
- Cui C, Noronha A, Morikawa H, Alvarez VA, Stuber GD, Szumlinski KK, Kash TL, Roberto M, Wilcox MV (2012) New insights on neurobiological mechanisms underlying alcohol addiction. *Neuropharmacology*. 67: 223-32.
- Curtis DR, Phillis JW, Watkins JC (1960) The chemical excitation of spinal neurones by certain acidic amino acids. *J Physiol*. 150: 656-82.
- Dahchour A, De Witte P (2003) Excitatory and inhibitory amino acid changes during repeated episodes of ethanol withdrawal: an in vivo microdialysis study. *Eur J Pharmacol*. 459 (2-3): 171-8.
- Dahchour A, De Witte P, Bolo N, Nédélec JF, Muzet M, Durbin P, Macher JP (1998) Central effects of acamprosate: part 1. Acamprosate blocks the glutamate increase in the nucleus accumbens microdialysate in ethanol withdrawn rats. *Psychiatry Res*. 82(2): 107-14.
- Danovitch I, Steiner AJ, Kazdan A, Goldenberg M, Haglund M, Mirocha J, Collison K, Vanle B, Dang J, IsHak WW (2017) Analysis of patient-reported outcomes of quality of life and functioning before and after treatment of major depressive disorder comorbid with alcohol use disorders. *Journal of Addiction Medicine*. 11 (1): 47-54.
- Daoust M, Saligaut C, Chadelaud M, Chretien P, Moore N, Boismare F (1984) Attenuation by antidepressant drugs of alcohol intake in rats. *Alcohol*. 1: 379-383.

- Davis LL, Wisniewski SR, Howland RH, Trivedi MH, Husain MM, Fava M, McGrath PJ, Balasubramani GK, Warden D, Rush AJ (2010) Does comorbid substance use disorder impair recovery from major depression with SSRI treatment? An analysis of the STAR*D level one treatment outcomes. *Drug Alcohol Depend.* 107(2-3): 161-70.
- Deng XS, Deitrich RA (2008) Putative role of brain acetaldehyde in ethanol addiction. *Current drug abuse reviews.* 1(1), 3-8.
- Deutsch DG, Chin SA (1993) Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist. *Biochem Pharmacol.* 46(5): 791-6.
- Devane WA, Dysarz FA, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC (1988) Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol.* 34: 605-13
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science.* 258: 1946-9.
- DeVido JJ, Weiss RD (2012) Treatment of the depressed alcoholic patient. *Curr Psychiatry Rep.* 14(6): 610-8.
- Dinh TP, Freund TF, Piomelli D (2002) A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation. *Chem Phys Lipids.* 121(1-2): 149-58.
- Duman RS, Malberg J, Thome J (1999) Neural plasticity to stress and antidepressant treatment. *Biol Psychiatry.* 46(9): 1181-91.
- Duman RS, Sanacora G, Krystal JH (2019) Altered Connectivity in Depression: GABA and Glutamate Neurotransmitter Deficits and Reversal by Novel Treatments. *Neuro.* 102(1): 75-90.
- Dundon W, Lynch KG, Pettinati HM, Lipkin C (2004) Treatment outcomes in type A and B alcohol dependence 6 months after serotonergic pharmacotherapy. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research.* 28: 1065-1073.
- Economidou D, Mattioli L, Cifani C, Perfumi M, Massi M, Cuomo V, Trabace L, Ciccocioppo R (2006) Effect of the cannabinoid CB1 receptor antagonist SR-141716A on ethanol self-administration and ethanol-seeking behaviour in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 183(4): 394-403.

- Edenberg HJ, Bosron WF (2018) Alcohol dehydrogenases, in *Comprehensive Toxicology. Elsevier Ltd, Oxford*. 3rd ed., Vol. 10 (McQueen CA ed): 126–145.
- Edenberg HJ, McClintick JN (2018) Alcohol Dehydrogenases, Aldehyde Dehydrogenases, and Alcohol Use Disorders: A Critical Review. *Alcohol Clin Exp Res*. 42(12): 2281-2297.
- Eggers ED, Berger AJ (2004) Mechanisms for the modulation of native glycine receptor channels by ethanol. *Journal of Neurophysiology*. 91: 2685-2695.
- Ehlers CL, Gilder DA, Gizer IR, Wilhelmsen KC (2019) Indexing the 'dark side of addiction': substance-induced affective symptoms and alcohol use disorders. *Addiction*. 114(1): 139-149.
- Eliwa H, Belzung C, Surget A (2017) Adult hippocampal neurogenesis: Is it the alpha and omega of antidepressant action? *Biochemical Pharmacology*. 141: 86-99.
- Erdozain AM, Rubio M, Valdizan EM, Pazos A, Meana JJ, Fernández-Ruiz J, Alexander SP, Callado LF (2015) The endocannabinoid system is altered in the post-mortem prefrontal cortex of alcoholic subjects. *Addict Biol*. 20(4): 773-83.
- Esteban S, García-Sevilla JA (2012) Effects induced by cannabinoids on monoaminergic systems in the brain and their implications for psychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 38(1): 78-87.
- Everitt BJ, Belin D, Economidou D, Pelloux Y, Dalley JW, Robbins TW (2008) Neural mechanisms underlying the vulnerability to develop compulsive drug-seeking habits and addiction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 363(1507): 3125-35.
- Fasoli F, Gotti C (2015) Structure of neuronal nicotinic receptors. En: Balfour DJK, Munafo MR (Eds), *Current topics in behavioral neurosciences*. (1-17). Cham: Springer International Publishing.
- Ferguson LB, Most D, Blednov YA, Harris RA (2014) PPAR agonists regulate brain gene expression: Relationship to their effects on ethanol consumption. *Neuropharmacology*. 86: 397–407.
- Fergusson DM, Boden JM, Horwood LJ (2009) Tests of causal links between alcohol abuse or dependence and major depression. *Arch Gen Psychiatry*. 66: 260–6.
- Ferrer B, Bermúdez-Silva FJ, Bilbao A, Alvarez-Jaimes L, Sanchez-Vera I, Giuffrida A, Serrano A, Baixeras E, Katuria S, Navarro M, Parsons LH, Piomelli D,

- Rodríguez de Fonseca F. (2007) Regulation of brain anandamide by acute administration of ethanol. *Biochem J.* 404: 97–104.
- Figueiredo A, Hamilton J, Marion M, Blum K, Kaczocha M, Haj-Dahmane S, Deutsch D, Thanos PK (2017) Pharmacological Inhibition of Brain Fatty Acid Binding Protein Reduces Ethanol Consumption in Mice. *J Reward Defic Syndr Addict Sci.* 3(2): 21–27.
- Foo JC, Streit F, Treutlein J, Ripke S, Witt SH, Strohmaier J, Degenhardt F, Forstner AJ, Hoffmann P5, Soyka M, Dahmen N, Scherbaum N, Wodarz N, Heilmann-Heimbach S, Herms S, Cichon S, Preuss U, Gaebel W, Ridinger M, Hoffmann S, Schulze TG, Maier W, Zill P, Müller-Myhsok B, Ising M, Lucae S, Nöthen MM, Mann K, Kiefer F, Rietschel M, Frank J; Major Depressive Disorder Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium (2018) Shared genetic etiology between alcohol dependence and major depressive disorder. *Psychiatr Genet.* 28(4): 66-70.
- Foulds JA, Adamson SJ, Boden JM, Williman JA, Mulder RT (2015a) Depression in patients with alcohol use disorders: Systematic review and meta-analysis of outcomes for independent and substance-induced disorders. *J Affect Disord.* 185: 47-59.
- Foulds JA, Douglas Sellman J, Adamson SJ, Boden JM, Mulder RT, Joyce PR (2015b) Depression outcome in alcohol dependent patients: an evaluation of the role of independent and substance-induced depression and other predictors. *J Affect Disord.* 174: 503-10.
- Fox HH, Gibas JT (1953) Synthetic tuberculostats. VII monoalkyl derivatives of isonicotinylhydrazine. *Journal of Organic Chemistry.* 18: 994–1002.
- Freund TF, Katona I, Piomelli D (2003) Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev.* 83: 1017–1066.
- Frye MA, Hinton DJ, Karpyak VM, Biernacka JM, Gunderson LJ, Feeder SE, Choi DS, Port JD (2016b) Anterior Cingulate Glutamate Is Reduced by Acamprosate Treatment in Patients With Alcohol Dependence. *J Clin Psychopharmacol.* 36(6): 669–674.
- Frye MA, Hinton DJ, Karpyak VM, Biernacka JM, Gunderson LJ, Geske J, Feeder SE, Choi DS, Port JD (2016a) Elevated Glutamate Levels in the Left Dorsolateral

- Prefrontal Cortex Are Associated with Higher Cravings for Alcohol. *Alcohol Clin Exp Res.* 40(8): 1609-16.
- Galinato MH, Takashima Y, Fannon MJ, Quach LW, Morales Silva RJ, Mysore KK, Terranova MJ, Dutta RR, Ostrom RW, Somkuwar SS, Mandyam CD (2018) Neurogenesis during Abstinence Is Necessary for Context-Driven Methamphetamine-Related Memory. *J Neurosci.* 38(8): 2029-2042.
- Gass JT, Olive MF (2008) Glutamatergic substrates of drug addiction and alcoholism. *Biochem. Pharmacol.* 75: 218-265.
- Gass JT, Sinclair CM, Cleva RM, Widholm JJ, Olive MF (2011) Alcohol-seeking behavior is associated with increased glutamate transmission in basolateral amygdala and nucleus accumbens as measured by glutamate-oxidase-coated biosensors. *Addict Biol.* 16(2): 215-28.
- Gass JT, Trantham-Davidson H, Kassab AS, Glen WB Jr, Olive MF, Chandler LJ (2014) Enhancement of extinction learning attenuates ethanol-seeking behavior and alters plasticity in the prefrontal cortex. *J Neurosci.* 34 (22): 7562–7574.
- Geisler S, Wise RA (2008) Functional implications of glutamatergic projections to the ventral tegmental area. *Rev Neurosci.* 19(4-5): 227-44.
- George DT, Herion DW, Jones CL, Phillips MJ, Hersh J, Hill D, Heilig M, Ramchandani VA, Geyer C, Spero DE, Singley ED, O'Malley SS, Bishai R, Rawlings RR, Kunos G (2010) Rimonabant (SR141716) has no effect on alcohol self-administration or endocrine measures in nontreatment-seeking heavy alcohol drinkers. *Psychopharmacology (Berl).* 208(1): 37-44.
- Gerace E, Landucci E, Bani D, Moroni F, Mannaioni G, Pellegrini-Giampietro DE (2019) Glutamate Receptor-Mediated Neurotoxicity in a Model of Ethanol Dependence and Withdrawal in Rat Organotypic Hippocampal Slice Cultures. *Front Neurosci.* 12: 1053.
- Getachew B, Hauser SR, Csoka AB, Taylor RE, Tizabi Y (2017) Role of cortical alpha-2 adrenoceptors in alcohol withdrawal-induced depression and tricyclic antidepressants. *Drug Alcohol Depend.* 175: 133–139.
- Getachew B, Hauser SR, Taylor RE, Tizabi Y (2008) Desipramine blocks alcohol-induced anxiety- and depressive-like behaviors in two rat strains. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior.* 91: 97-103.

- Getachew B, Hauser SR, Taylor RE, Tizabi Y (2010) Alcohol-induced depressive-like behavior is associated with cortical norepinephrine reduction. *Pharmacol Biochem Behav.* 96(4): 395-401.
- Gianessi CA, Groman SM, Thompson SL, Jiang M, van der Stelt M, Taylor JR (2019) Endocannabinoid contributions to alcohol habits and motivation: Relevance to treatment. *Addict Biol.* e12768. [Epub ahead of print]
- Gimeno C, Dorado ML, Roncero C, Szerman N, Vega P, Balanzá-Martínez V, Alvarez FJ (2017) Treatment of Comorbid Alcohol Dependence and Anxiety Disorder: Review of the Scientific Evidence and Recommendations for Treatment. *Front Psychiatry.* 8: 173.
- Glass M, Dragunow M, Faull RLM (1997) Cannabinoid receptors in the human brain: A detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience.* 77: 299-318.
- Goeldner FO, Pigatto G, Ribeiro AF, Machado HB, Boerngen-Lacerda R (2005) Influence of fluoxetine and paroxetine in behavioral sensitization induced by ethanol in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 82(2): 388-96.
- Goh ET, Morgan MY (2017) Review article: pharmacotherapy for alcohol dependence - the why, the what and the wherefore. *Aliment Pharmacol Ther.* 45(7): 865-882.
- Gong JP, Onaivi ES, Ishiguro H, Liu QR, Tagliaferro PA, Brusco A, Uhl GR (2006) Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res.* 1071: 10-23.
- Gong MF, Wen RT, Xu Y, Pan JC, Fei N, Zhou YM, Xu JP8, Liang JH, Zhang HT (2017) Attenuation of ethanol abstinence-induced anxiety- and depressive-like behavior by the phosphodiesterase-4 inhibitor rolipram in rodents. *Psychopharmacology.* 234(20):3143-3151.
- González S, Valenti M, de Miguel R, Fezza F, Fernández-Ruiz J, Di Marzo V, Ramos JA (2004) Changes in endocannabinoid contents in reward-related brain regions of alcohol-exposed rats, and their possible relevance to alcohol relapse. *Br J Pharmacol.* 143(4): 455–464.

- Goodwani S, Saternos H, Alasmari F, Sari Y (2017) Metabotropic and ionotropic glutamate receptors as potential targets for the treatment of alcohol use disorder. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 77: 14-31.
- Gorzalka BB, Hill MN (2011) Putative role of endocannabinoid signaling in the etiology of depression and actions of antidepressants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 35(7): 1575-85.
- Graham K, Massak A (2007) Alcohol consumption and the use of antidepressants. *CMAJ*. 176(5): 633-637.
- Gulley JM, McNamara C, Barbera TJ, Ritz MC, George FR (1995) Selective serotonin reuptake inhibitors: Effects of chronic treatment on ethanol-reinforced behavior in mice. *Alcohol*. 12(3): 177-181.
- Haile CN, Kosten TA (2017) The peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist fenofibrate attenuates alcohol self-administration in rats. *Neuropharmacology*. pii: S0028-3908(17)30007-2.
- Hajszan T, Dow A, Warner-Schmidt JL, Szigeti-Buck K, Sallam NL, Parducz A, Leranth C, Duman RS (2009) Remodeling of hippocampal spine synapses in the rat learned helplessness model of depression. *Biol. Psychiatry*. 65: 392-400.
- Hald J, Jacobsen E, Larsen V (1948) The sensitizing effect of tetraethylthiuramdisulphide (antabuse) to ethylalcohol. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*, 4: 285-296.
- Hamon M, Blier P (2013) Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 45: 54-63.
- Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I, Mechoulam R (2001) 2-Arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci*. 98(7): 3662-5.
- Hardingham GE, Bading H (2003) The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends Neurosci*. 26(2): 81-9.
- Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H (2002) Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci*. 5(5): 405-14.
- Harford TC, Yi HY, Faden VB, Chen CM (2009) Alcohol craving and the dimensionality of alcohol disorders. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 33, 868-878

- Hashimoto K, Sawa A, Iyo M (2007) Increased levels of glutamate in brains from patients with mood disorders. *Biol Psychiatry*. 62: 1310-1316.
- Hasin DS, Grant BF (2015) The National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions (NESARC) Waves 1 and 2: review and summary of findings. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol*. 50(11):1609-40.
- Hasin DS, Stinson FS, Ogburn E, Grant BF (2007) Prevalence, correlates, disability, and comorbidity of DSM-IV alcohol abuse and dependence in the United States: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. *Arch Gen Psychiatry*. 64:830–842.
- Hatzigiakoumis DS, Martinotti G, Giannantonio MD, Janiri L (2011) Anhedonia and substance dependence: clinical correlates and treatment options. *Front Psychiatry*. 2:10.
- Hayashi T (1954) Effects of sodium glutamate on the nervous system. *Keio J Med*. 3: 192–193.
- Hayrapetyan V, Jenschke M, Dillon GH, Machu TK (2005) Coexpression of the 5-HT3B subunit with the 5-HT3A receptor reduces alcohol sensitivity. *Molecular Brain Research*. 142: 146-150.
- Heilig M, Egli M (2006) Pharmacological treatment of alcohol dependence: target symptoms and target mechanisms. *Pharmacol Ther*. 111(3): 855-76.
- Heimer L, Alheid GF (1991) Piecing together the Puzzle of Basal Forebrain Anatomy. En: Napier TC, Kalivas PW, Hanin I (Eds), The Basal Forebrain. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 295. Boston, MA: Springer.
- Henderson-Redmond AN, Guindon J, Morgan DJ (2016) Roles for the endocannabinoid system in ethanol-motivated behavior. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 65: 330-9.
- Heninger GR, Delgado PL, Charney DS (1996) The revised monoamine theory of depression: a modulatory role for monoamines, based on new findings from monoamine depletion experiments in humans. *Pharmacopsychiatry*. 29(1): 2-11.
- Hermann D, Weber-Fahr W, Sartorius A, Hoerst M, Frischknecht U, Tunc-Skarka N, Perreau-Lenz S, Hansson AC, Krumm B, Kiefer F, Spanagel R, Mann K, Ende G, Sommer WH (2012) Translational magnetic resonance spectroscopy reveals

- excessive central glutamate levels during alcohol withdrawal in humans and rats. *Biol Psychiatry*. 71(11): 1015-21.
- Hermens DF, Chitty KM, Lee RS, Tickell A, Haber PS, Naismith SL, Hickie IB, Lagopoulos J (2015) Hippocampal glutamate is increased and associated with risky drinking in young adults with major depression. *J Affect Disord*. 186: 95-8.
- Hill AS, Sahay A, Hen R (2015) Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to reduce anxiety and depression-like behaviors. *Neuropsychopharmacology*. 40(10): 2368-2378.
- Hill MN, Carrier EJ, McLaughlin RJ, Morrish AC, Meier SE, Hillard CJ, Gorzalka BB (2008c) Regional alterations in the endocannabinoid system in an animal model of depression: effects of concurrent antidepressant treatment. *J Neurochem*. 106: 2322–36.
- Hill MN, Gorzalka BB (2005a) Is there a role for the endocannabinoid system in the etiology and treatment of melancholic depression? *Behav Pharmacol*. 16: 333-352.
- Hill MN, Gorzalka BB (2005b) Pharmacological enhancement of cannabinoid CB1 receptor activity elicits an antidepressant-like response in the rat forced swim test. *Eur Neuropsychopharmacol*. 15: 593–599.
- Hill MN, Ho WS, Hillard CJ, Gorzalka BB (2008b) Differential effects of the antidepressants tranylcypromine and fluoxetine on limbic cannabinoid receptor binding and endocannabinoid contents. *J Neural Transm*. 115: 1673-1679.
- Hill MN, Ho WS, Sinopoli KJ, Viau V, Hillard CJ, Gorzalka BB (2006) Involvement of the endocannabinoid system in the ability of long-term tricyclic antidepressant treatment to suppress stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuropsychopharmacology*. 31(12): 2591-9.
- Hill MN, Miller GE, Carrier EJ, Gorzalka BB, Hillard CJ (2009) Circulating endocannabinoids and N-acyl ethanolamines are differentially regulated in major depression and following exposure to social stress. *Psychoneuroendocrinology*. 34: 1257-1262.

- Hill MN, Miller GE, Ho WS, Gorzalka BB, Hillard CJ (2008a) Serum endocannabinoid content is altered in females with depressive disorders: a preliminary report. *Pharmacopsychiatry*. 41: 48-53.
- Hillemacher T, Frieling H (2019) Pharmacotherapeutic options for co-morbid depression and alcohol dependence. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 1–23.
- Hillhouse TM, Porter JH (2015) A brief history of the development of antidepressant drugs: from monoamines to glutamate. *Exp Clin Psychopharmacol*. 23(1): 1–21.
- Hirth N, Meinhardt MW, Noori HR, Salgado H, Torres-Ramirez O, Uhrig S, Broccoli L, Vengeliene V, Roßmanith M, Perreau-Lenz S, Köhr G, Sommer WH, Spanagel R, Hansson AC (2016) Convergent evidence from alcohol-dependent humans and rats for a hyperdopaminergic state in protracted abstinence. *Proc Natl Acad Sci USA*. 113(11): 3024–3029.
- Ho AM, Qiu Y, Jia YF, Aguiar FS, Hinton DJ, Karpyak VM, Weinshilboum RM, Choi DS (2016) Combined Effects of Acamprosate and Escitalopram on Ethanol Consumption in Mice. *Alcohol Clin Exp Res*. 40(7): 1531-9.
- Holleran KM, Wilson HH, Fetterly TL, Bluett RJ, Centanni SW, Gilfarb RA, Rocco LE, Patel S, Winder DG (2016) Ketamine and MAG lipase inhibitor-dependent reversal of evolving depressive-like behavior during forced abstinence from alcohol drinking. *Neuropsychopharmacology*. 41(8): 2062-2071.
- Horwitz AV, Wakefield JC, Lorenzo-Luaces L (2016) History of depression. En: Rubeisand RJ, Strunk DR (Eds) *The Oxford Handbook of Mood Disorders*. Oxford: Oxford University Press.
- Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG (2002) Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev*. 54: 161–202.
- Howlett AC, Quail JM, Khachatrian LL (1986) Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. *Mol Pharmacol*. 29(3): 307-13.
- Hungund BL, Basavarajappa BS (2004) Role of endocannabinoids and cannabinoid CB1 receptors in alcohol-related behaviors. *Ann N Y Acad Sci*. 1025: 515-27.
- Hwa L, Besheer J, Kash T (2017) Glutamate plasticity woven through the progression to alcohol use disorder: a multi-circuit perspective. *F1000Res*. 6: 298.

- Hwa LS, Nathanson AJ, Shimamoto A, Tayeh JK, Wilens AR, Holly EN, Newman EL, DeBold JF, Miczek KA (2015) Aggression and increased glutamate in the mPFC during withdrawal from intermittent alcohol in outbred mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 232(16): 2889–2902.
- Ieraci A, Mallei A, Popoli M Social (2016) Isolation Stress Induces Anxious-Depressive-Like Behavior and Alterations of Neuroplasticity-Related Genes in Adult Male Mice. *Neural Plast*. 2016: 6212983.
- Iovieno N, Tedeschini E, Bentley KH, Evins AE, Papakostas GI (2011) Antidepressants for major depressive disorder and dysthymic disorder in patients with comorbid alcohol use disorders: a meta-analysis of placebo-controlled randomized trials. *J Clin Psychiatry*. 72(8): 1144-51.
- Ishiguro H, Iwasaki S, Teasensitz L, Higuchi S, Horiuchi Y, Saito T, Arinami T, Onaivi ES (2007) Involvement of cannabinoid CB2 receptor in alcohol preference in mice and alcoholism in humans. *Pharmacogenom J*. 7: 380-385.
- Jackson B, Brocker C, Thompson DC, Black W, Vasiliou K, Nebert DW, Vasiliou V (2011) Update on the aldehyde dehydrogenase gene (ALDH) superfamily. *Hum Genomics*. 5: 283–303.
- Janiri L, Gobbi G, Mannelli P, Pozzi G, Serretti A, Tempesta E (1996) Effects of fluoxetine at antidepressant doses on short-term outcome of detoxified alcoholics. *Int Clin Psychopharmacol*. 11(2): 109–117.
- Jaramillo AA, Randall PA, Stewart S, Fortino B, Van Voorhies K, Besheer J (2017) Functional role for cortical-striatal circuitry in modulating alcohol self-administration. *Neuropharmacology*. 130: 42–53.
- Jones AW, Jonsson KA, Kechagias S (1997) Effect of high-fat, high-protein, and high-carbohydrate meals on the pharmacokinetics of a small dose of ethanol. *Br J Clin Pharmacol*. 44 (6), pp. 521-526
- June HL, Gilpin NW (2010) Operant self-administration models for testing the neuropharmacological basis of ethanol consumption in rats. *Curr Protoc Neurosci*. Chapter 9: Unit–9.12.26.
- Kähkönen S, Wilenius J, Nikulin VV, Ollikainen M, Ilmoniemi RJ (2003) Alcohol reduces prefrontal cortical excitability in humans: a combined TMS and EEG study. *Neuropsychopharmacology*. 28(4): 747-54.

- Kalivas PW (2009) The glutamate homeostasis hypothesis of addiction. *Nat Rev Neurosci.* 10: 561–72.
- Kalivas PW, Volkow ND (2005) The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *Am J Psychiatry.* 162: 1403-1413.
- Kalivas PW, Volkow ND (2011) New medications for drug addiction hiding in glutamatergic neuroplasticity. *Mol Psychiatry.* 16(10): 974-86.
- Kempermann G, Gage FH, Aigner L, Song H, Curtis MA, Thuret S, Kuhn HG, Jessberger S, Frankland PW, Cameron HA, Gould E, Hen R, Abrous DN, Toni N, Schinder AF, Zhao X, Lucassen PJ, Frisén J (2018) Human Adult Neurogenesis: Evidence and Remaining Questions. *Cell Stem Cell.* 23(1): 25-30.
- Kim HJ , Park SD , Lee RM , Lee BH , Choi SH , Hwang SH , Rhim H , Kim HC , Nah SY (2017) Gintonin attenuates depressive-like behaviors associated with alcohol withdrawal in mice. *J Affect Disord.* 215: 23-29.
- Kim Y, Hack LM, Ahn ES, Kim J (2018) Practical outpatient pharmacotherapy for alcohol use disorder. *Drugs Context.* 7: 212308.
- Koethe D, Llenos IC, Dulay JR, Hoyer C, Torrey EF, Leweke FM, Weis S (2007) Expression of CB1 cannabinoid receptor in the anterior cingulate cortex in schizophrenia, bipolar disorder, and major depression. *J Neural Transm (Vienna).* 114(8): 1055-63.
- Koob G, Kreek, MJ (2007) Stress, dysregulation of drug reward pathways, and the transition to drug dependence. *The American journal of psychiatry.* 164 (8): 1149-59.
- Koob GF (2014) Neurocircuitry of alcohol addiction: synthesis from animal models. *Handb Clin Neurol.* 125: 33–54.
- Koob GF (2015) The dark side of emotion: the addiction perspective. *Eur J Pharmacol.* 753:73-87.
- Koob GF, Le Moal M (2001) Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology.* 24: 97–129.
- Koob GF, Volkow ND (2009) Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology.* 35(1): 217-38.
- Koob GF, Volkow ND (2016) Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *Lancet Psychiatry.* 3(8):760-73.

- Koolschijn PC, van Haren NE, Lensvelt-Mulders GJ, Hulshoff Pol HE, Kahn RS (2009) Brain volume abnormalities in major depressive disorder: a meta-analysis of magnetic resonance imaging studies. *Hum Brain Mapp.* 30: 3719-3735.
- Kranzler HR, Del Boca FK, Rounsaville BJ (1996) Comorbid psychiatric diagnosis predicts three-year outcomes in alcoholics: a posttreatment natural history study. *J Stud Alcohol.* 57: 619–626.
- Kranzler HR, Soyka M (2018) Diagnosis and Pharmacotherapy of Alcohol Use Disorder: A Review. *JAMA.* 320(8): 815-824.
- Kroener S, Mulholland PJ, New NN, Gass JT, Becker HC, Chandler LJ (2012) Chronic alcohol exposure alters behavioral and synaptic plasticity of the rodent prefrontal cortex. *PLoS One.* 7(5): e37541.
- Krugers HJ, Hoogenraad CC, Groc L (2010) Stress hormones and AMPA receptor trafficking in synaptic plasticity and memory. *Nat Rev Neurosci.* 11: 675-681.
- Kryger R, Wilce PA (2010) The effects of alcoholism on the human basolateral amygdala. *Neuroscience.* 167(2): 361-71.
- Krylov, BV, Vilin, YY, Katina, IE, Podzorova, SA (2000) Ethanol modulates the ionic permeability of sodium channels in rat sensory neurons. *Neuroscience and Behavioral Physiology.* 30: 331-337.
- Kuhn R (1958) The treatment of depressive states with G 22355 (imipramine hydrochloride). *Am J Psychiatry.* 115: 459–464.
- Kyzar EJ, Pandey SC (2015) Molecular mechanisms of synaptic remodeling in alcoholism. *Neurosci Lett.* 601:11-9.
- Lafreniere JD, Kelly, MEM (2018) Potential for Endocannabinoid System Modulation in Ocular Pain and Inflammation: Filling the Gaps in Current Pharmacological Options. *Neuronal Signal.* NS20170144.
- Lapin IP, Oxenkrug GF (1969) Intensification of the central serotonergic processes as a possible determinant of the thymoleptic effect. *Lancet.* 1: 132–6.
- Lauckner JE, Jensen JB, Chen HY, Lu HC, Hille B, Mackie K (2008) GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105(7): 2699–2704.
- Laurent V, Morse AK, Balleine BW (2014) The role of opioid processes in reward and decision-making. *British journal of pharmacology.* 172 (2): 449-59.

- Le Maître TW, Dhanabalan G, Bogdanovic N, Alkass K, Druid H (2018) Effects of alcohol abuse on proliferating cells, stem/progenitor cells, and immature neurons in the adult human hippocampus. *Neuropsychopharmacology*. 43(4): 690-699.
- Lee MR, Leggio L (2014) Combined pharmacotherapies for the management of alcoholism: rationale and evidence to date. *CNS Drugs*. 28(2): 107–19.
- Levy MJF, Bouille F, Steinbusch HW, van den Hove DLA, Kenis G, Lanfumey L (2018) Neurotrophic factors and neuroplasticity pathways in the pathophysiology and treatment of depression. *Psychopharmacology (Berl)*. 235(8): 2195–2220.
- Liang J, Olsen RW (2014) Alcohol use disorders and current pharmacological therapies: the role of GABA (A) receptors. *Acta pharmacologica Sinica*. 35(8): 981-93.
- Lieber CS, DeCarli LM (1968) Ethanol oxidation by hepatic microsomes: Adaptive increase after ethanol feeding. *Science*. 162: 917—18.
- Lieber CS, DeCarli LM (1970) Hepatic microsomal ethanol-oxidating system. In vitro characteristics and adaptive properties in vivo. *J Biol Chem*. 245: 2505—12.
- Lindros KO, Eriksson CJP (1975) The role of acetaldehyde in the action of ethanol. Finnish Foundation Stud. *Alc*. 23.
- Liu B, Liu J, Wang M, Zhang Y, Li L (2017) From Serotonin to Neuroplasticity: Evolvement of Theories for Major Depressive Disorder. *Front Cell Neurosci*. 11: 305.
- Liu J, Vaithianathan T, Manivannan K, Parrill A, Dopico AM (2008) Ethanol modulates BKCa channels by acting as an adjuvant of calcium. *Molecular Pharmacology*, 74: 628-640.
- Loomer HP, Saunders JC, Kline NS (1957) A clinical and pharmacodynamic evaluation of iproniazid as a psychic energizer. *Psychiatr Res Rep Am Psychiatr Assoc*. 8: 129-41.
- López-Moreno JA, González-Cuevas G, Rodríguez de Fonseca F, Navarro M (2004) Long-lasting increase of alcohol relapse by the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 during alcohol deprivation. *J Neurosci*. 24: 8245–8252.
- Lorenzetti V, Allen NB, Fornito A, Yücel M (2009) Structural brain abnormalities in major depressive disorder: A selective review of recent MRI studies. *J Affect Disord*. 117: 1-17.

- Lovinger DM (1997) Serotonin's role in alcohol's effects on the brain. *Alcohol and Health Research World, Neuroscience: Pathways of Addiction*. 21 (2): 114-119.
- Lovinger DM, Roberto M (2013) Synaptic effects induced by alcohol. *Curr Top Behav Neurosci*. 13:31-86.
- Lynch JW (2009) Native glycine receptor subtypes and their physiological roles. *Neuropharmacology*. 56: 303-309.
- Maejima T, Oka S, Hashimoto-dani Y, Ohno-Shosaku T, Aiba A, Wu D, Waku K, Sugiura T, Kano M (2005) Synaptically driven endocannabinoid release requires Ca²⁺-assisted metabotropic glutamate receptor subtype 1 to phospholipase C β 4 signaling cascade in the cerebellum. *J Neurosci*. 25: 6826–6835.
- Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS (2000) Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience*. 20(24): 9104-9110.
- Maler JM, Esselmann H, Wiltfang J, Kunz N, Lewczuk P, Reulbach U, Bleich S, R  ther E, Kornhuber J (2005) Memantine inhibits ethanol-induced NMDA receptor up-regulation in rat hippocampal neurons. *Brain Res*. 1052(2): 156-62.
- Mandyam CD, Koob GF (2012) The addicted brain craves new neurons: Putative role for adult-born progenitors in promoting recovery. *Trends in Neurosciences*. 35 (4): 250-260.
- Mandyam CD, Somkuwar SS, Oliver RJ, Takashima Y (2018) New Neurons in the Dentate Gyrus Promote Reinstatement of Methamphetamine Seeking. *J Exp Neurosci*. 12: 1179069518779625.
- Mann K (2004) Pharmacotherapy of alcohol dependence: A review of the clinical data. *CNS Drugs*. 18(8): 485-504.
- Manzanas J, Caba  ero D, Puente N, García-Gutiérrez MS, Grandes P, Maldonado R (2018) Role of the endocannabinoid system in drug addiction. *Biochem Pharmacol*. 157: 108-121.
- Marcinkiewicz CA (2015) Serotonergic Systems in the Pathophysiology of Ethanol Dependence: Relevance to Clinical Alcoholism. *ACS Chem Neurosci*. 6(7): 1026-39.

- Marcinkiewicz CA, Lowery-Gionta EG, Kash TL (2016) Serotonin's Complex Role in Alcoholism: Implications for Treatment and Future Research. *Alcohol Clin Exp Res.* 40(6): 1192-201.
- Marin MT, Morais-Silva G (2017) Ethanol's Action Mechanisms in the Brain: From Lipid General Alterations to Specific Protein Receptor Binding. En: WatsonRR, Zibadi S (Eds), Addictive Substances and Neurological Disease. Edition: 1. Chapter: 16. Academic Press.
- Markou A, Kosten TR, Koob GF (1998) Neurobiological similarities in depression and drug dependence: A self-medication hypothesis. *Neuropsychopharmacology.* 18(3): 135-174.
- Marquez-Arrico JE, Río-Martínez L, Navarro JF, Prat G, Adan A (2019) Personality Profile and Clinical Correlates of Patients With Substance Use Disorder With and Without Comorbid Depression Under Treatment. *Front Psychiatry.* 9: 764.
- Marszalec W, Aistrup GL, Narahashi T (1999) Ethanol-nicotine interactions at a-bungarotoxin-insensitive nicotinic acetylcholine receptors in rat cortical neurons. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research.* 23, 439-445.
- Mateus-Pinheiro A, Pinto L, Bessa JM, Morais M, Alves ND, Monteiro S, Patrício P, Almeida OF, Sousa N (2013) Sustained remission from depressive-like behavior depends on hippocampal neurogenesis. *Transl Psychiatry.* 3: e210.
- Mato S, Pilar-Cuéllar F, Valdizán EM, González-Maeso J, Rodríguez-Puertas R, Meana J, Sallés J, Crespo-Facorro B, Pazos Á (2018) Selective up-regulation of cannabinoid CB1 receptor coupling to Go-proteins in suicide victims with mood disorders. *Biochem Pharmacol.* 157: 258-265.
- Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GC, Kasai H (2004) Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature.* 429 (6993): 761–766.
- Maynard ME, Leasure JL (2013) Exercise enhances hippocampal recovery following binge ethanol exposure. *PLoS ONE.* 8(9): e76644.
- Mazzola C, Medalie J, Scherma M, Panlilio LV, Solinas M, Tanda G, Drago F, Cadet JL, Goldberg SR, Yasar S (2009) Fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibition enhances memory acquisition through activation of PPAR-alpha nuclear receptors. *Learn Mem.* 16(5): 332–337.

- McIntyre RS, Filteau MJ, Martin L, Patry S, Carvalho A, Cha DS, Barakat M, Miguelez M (2014) Treatment-resistant depression: definitions, review of the evidence, and algorithmic approach. *J Affect Disord.* 156: 1–7.
- Mechoulam R (1986) The pharmacohistory of Cannabis sativa Cannabinoids as Therapeutic Agents. Mechoulam, R. 1–19. Boca Raton, FL: *CRC Press*.
- Mechoulam R, Parker LA (2013) The endocannabinoid system and the brain. *Annu Rev Psychol* 64: 21–47.
- Melis M, Spiga S, Diana M (2005) The Dopamine Hypothesis of Drug Addiction: Hypodopaminergic State. *International Review of Neurobiology.* 101–154.
- Menkes DB, Herxheimer A (2014) Interaction between antidepressants and alcohol: Signal amplification by multiple case reports. *The International Journal of Risk & Safety in Medicine.* 26(3): 163-170.
- Micale V, Di Marzo V, Sulcova A, Wotjak CT, Drago F (2013) Endocannabinoid system and mood disorders: priming a target for new therapies. *Pharmacol Ther.* 138(1): 18-37.
- Michael-Titus AT, Bains S, Jeetle J, Whelpton R (2000) Imipramine and phenelzine decrease glutamate overflow in the prefrontal cortex--a possible mechanism of neuroprotection in major depression? *Neuroscience.* 100: 681-684.
- Mihalak KB, Carroll FI, Luetje CW (2006) Varenicline is a partial agonist at $\alpha 4\beta 2$ and a full agonist at $\alpha 7$ neuronal nicotinic receptors. *Mol Pharmacol.* 70: 801–805.
- Mittrirattanakul S, Lopez-Valdes HE, Liang J, Matsuka Y, Mackie K, Faull KF, Spigelman I (2007) Bidirectional alterations of hippocampal cannabinoid 1 receptors and their endogenous ligands in a rat model of alcohol withdrawal and dependence. *Alcohol Clin Exp Res.* 31: 855–67.
- Moran Y, Barzilai MG, Liebeskind BJ, Zakon HH (2015) Evolution of voltage-gated ion channels at the emergence of Metazoa. *The Journal of Experimental Biology.* 218: 515-525.
- Moriguchi S, Takamiya A, Noda Y, Horita N, Wada M, Tsugawa S, Plitman E, Sano Y, Tarumi R, ElSalhy M, Katayama N, Ogyu K, Miyazaki T, Kishimoto T, Graff-Guerrero A, Meyer JH, Blumberger DM, Daskalakis ZJ, Mimura M, Nakajima S (2018) Glutamatergic neurometabolite levels in major depressive disorder: a

- systematic review and meta-analysis of proton magnetic resonance spectroscopy studies. *Mol Psychiatry*.
- Möykkynen T, Korpi ER (2012) Acute effects of ethanol on glutamate receptors. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 111(1): 4-13.
- Muhonen LH, Lonngvist J, Juva K, Alho (2008) Double-blind, randomized comparison of memantine and escitalopram for the treatment of major depressive disorder comorbid with alcohol dependence. *Journal of Clinical Psychiatry*. 69: 392–399.
- Muller JC, Pryor WW, Gibbons JE, Orgain ES (1955) Depression and anxiety occurring during rauwolfia therapy. *Journal of the American Medical Association*. 159: 836–839.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 365: 61–65.
- Musazzi L, Milanese M, Farisello P, Zappettini S, Tardito D, Barbiero VS, Bonifacino T, Mallei A, Baldelli P, Racagni G, Raiteri M, Benfenati F, Bonanno G, Popoli M (2010) Acute stress increases depolarization-evoked glutamate release in the rat prefrontal/frontal cortex: the dampening action of antidepressants. *PLoS One*. 5(1): e8566.
- Musazzi L, Treccani G, Mallei A, Popoli M (2013) The action of antidepressants on the glutamate system: regulation of glutamate release and glutamate receptors. *Biol Psychiatry*. 73(12): 1180-8.
- Naglich AC, Lin A, Wakhlu S, Adinoff BH (2017) Systematic Review of Combined Pharmacotherapy for the Treatment of Alcohol Use Disorder in Patients Without Comorbid Conditions. *CNS Drugs*. 32(1): 13–31.
- Nagy J (2008) Alcohol related changes in regulation of NMDA receptor functions. *Curr. Neuropharmacol*. 6: 39-54.
- Naranjo CA, Poulos CX, Bremner KE, Lanctot KL (1994) Fluoxetine attenuates alcohol intake and desire to drink. *Int Clin Psychopharmacol*. (3): 163-72.
- Navarrete F, García-Gutiérrez MS, Manzanares J (2018) Pharmacological regulation of cannabinoid CB2 receptor modulates the reinforcing and motivational actions of ethanol. *Biochem Pharmacol*. 157: 227-234.

- Ng E, Browne CJ, Samsom JN, Wong AHC (2017) Depression and substance use comorbidity: What we have learned from animal studies. *Am J Drug Alcohol Abuse*. 43(4): 456-474.
- Nicholson ER, Dilley JE, Froehlich JC (2018) Co-Administration of Low-Dose Naltrexone and Bupropion Reduces Alcohol Drinking in Alcohol-Preferring (P) Rats. *Alcohol Clin Exp Res*. 42(3): 571–577.
- Niswender CM, Conn PJ (2010) Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu. Rev Pharmacol Toxicol*. 50: 295–322.
- Norberg A, Jones AW, Hahn RG, Gabrielsson JL (2003) Role of variability in explaining ethanol pharmacokinetics: Research and forensic applications. *Clin Pharmacokinet*. 42 (1): 1-31.
- Nunes EV, Levin FR (2004) Treatment of depression in patients with alcohol or other drug dependence: A meta-analysis. *JAMA*. 291(15):1887-1896.
- Nunes EV, Levin FR (2008) Treatment of co-occurring depression and substance dependence: Using meta-analysis to guide clinical recommendations. *Psychiatric Annals*. 38(11).
- O'Brien CP, Volpicelli LA, Volpicelli JR (1996) Naltrexone in the treatment of alcoholism: a clinical review. *Alcohol*. 13: 35.
- O'Sullivan SE (2007) Cannabinoids go nuclear: Evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Br J Pharmacol*. 152: 576–582.
- Ogawa S, Kunugi H (2015) Inhibitors of Fatty Acid Amide Hydrolase and Monoacylglycerol Lipase: New Targets for Future Antidepressants. *Current Neuropsychopharmacology*. 13(6), 760–775.
- Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T, Ueda N (2004) Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J Biol Chem*. 279: 5298-5305.
- Olsen RW (2018) GABAA receptor: Positive and negative allosteric modulators. *Neuropharmacology*. 1;136(Pt A): 10-22.
- Olsen RW, Homanics GE (2000) Function of GABAA receptors: insights from mutant and knockout mice. En: Martin DL, Olsen RW (Eds), *GABA in the Nervous System: The View at 50 Years*. 81–96. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins.

- Olsufka RA, Peng H, Newton JS, Nixon K (2018) Alcohol effects on adult neural stem cells—A novel mechanism of neurotoxicity and recovery in alcohol use disorders. En: Rasmussen TP (Ed), *Stem Cells in Birth Defects Research and Developmental Toxicology*. Hoboken, NJ: Wiley.
- Onaivi ES, Ishiguro H, Gong JP, Patel S, Meozzi PA, Myers L, Perchuk A, Mora Z, Tagliaferro PA, Gardner E, Brusco A, Akinshola BE, Liu QR, Chirwa SS, Hope B, Lujilde J, Inada T, Iwasaki S, Macharia D, Teasentfitz L, Arinami T, Uhl GR (2008a) Functional expression of brain neuronal CB2 cannabinoid receptors are involved in the effects of drugs of abuse and in depression. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1139: 434–449.
- Onaivi ES, Ishiguro H, Gong JP, Patel S, Meozzi PA, Myers L, Perchuk A, Mora Z, Tagliaferro PA, Gardner E, Brusco A, Akinshola BE, Hope B, Lujilde J, Inada T, Iwasaki S, Macharia D, Teasentfitz L, Arinami T, Uhl GR (2008b) Brain neuronal CB2 cannabinoid receptors in drug abuse and depression: from mice to human subjects. *PLoS One*. 3 (2) Article e1640.
- Onaivi ES, Ishiguro H, Sejal P, Meozzi PA, Myers L, Tagliaferro P, Hope B, Leonard CM, Uhl GR, Brusco A, Gardner E (2006) Methods to study the behavioral effects and expression of CB2 cannabinoid receptor and its gene transcripts in the chronic mild stress model of depression. *Methods Mol Med*. 123: 291-8.
- Ortega-Álvaro A, Ternianov A, Aracil-Fernández A, Navarrete F, García-Gutiérrez MS, Manzanares J (2015) Role of cannabinoid CB2 receptor in the reinforcing actions of ethanol. *Addict Biol*. 20(1): 43-55.
- Ortiz S, Oliva JM, Pérez-Rial S, Palomo T, Manzanares J (2004) Chronic ethanol consumption regulates cannabinoid CB1 receptor gene expression in selected regions of rat brain. *Alcohol Alcohol*. 39(2): 88-92.
- O'Sullivan SE (2016) An update on PPAR activation by cannabinoids. *Br J Pharmacol*. 173(12): 1899–1910.
- Owens MJ, Morgan WN, Plott SJ, Nemeroff CB (1997) Neurotransmitter receptor and transporter binding profile of antidepressants and their metabolites. *J Pharmacol Exp Ther*. 283(3): 1305-22.
- Pandey SC, Kyzar EJ, Zhang H (2017) Epigenetic basis of the dark side of alcohol addiction. *Neuropharmacology*. 122: 74-84.

- Pang TY, Renoir T, Du X, Lawrence AJ, Hannan AJ (2013) Depression-related behaviours displayed by female C57BL/6J mice during abstinence from chronic ethanol consumption are rescued by wheel-running. *The European Journal of Neuroscience*. 37(11): 1803-1810.
- Papakostas GI, Thase ME, Fava M, Nelson JC, Shelton RC (2007) Are antidepressant drugs that combine serotonergic and noradrenergic mechanisms of action more effective than the selective serotonin reuptake inhibitors in treating major depressive disorder? A meta-analysis of studies of newer agents. *Biol Psychiatry*. 62(11): 1217-27.
- Paterson NE, Markou A (2007) Animal models and treatments for addiction and depression co-morbidity. *Neurotox Res*. 11: 1–32.
- Pava MJ, Woodward JJ (2012) A review of the interactions between alcohol and the endocannabinoid system: implications for alcohol dependence and future directions for research. *Alcohol*. 46(3): 185-204.
- Paxinos G, Watson C (2007) The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th Edition. Academic Press.
- Peng L, Bonaguidi MA (2018) Function and dysfunction of adult hippocampal neurogenesis in regeneration and disease. *The American Journal of Pathology*. 188(1): 23-28.
- Peng Q, Bizon C, Gizer IR, Wilhelmsen KC, Ehlers CL (2019) Genetic loci for alcohol-related life events and substance-induced affective symptoms: indexing the "dark side" of addiction. *Transl Psychiatry*. 9(1): 71.
- Peterlik D, Flor PJ, Uschold-Schmidt N (2016) The Emerging Role of Metabotropic Glutamate Receptors in the Pathophysiology of Chronic Stress-Related Disorders. *Curr Neuropharmacol*. 14(5): 514–539.
- Pettinati HM, O'Brien CP, Dundon WD (2013) Current status of co-occurring mood and substance use disorders: a new therapeutic target. *Am J Psychiatry*. 170(1): 23-30.
- Pettinati HM, Volpicelli JR, Kranzler HR, Luck G, Rukstalis MR, Cnaan A (2000) Sertraline treatment for alcohol dependence: interactive effects of medication and alcoholic subtype. *Alcohol Clin Exp Res*. 24(7): 1041-9.

- Pittaluga A, Raiteri L, Longordo F, Luccini E, Barbiero VS, Racagni G, Popoli M, Raiteri M (2007) Antidepressant treatments and function of glutamate ionotropic receptors mediating amine release in hippocampus. *Neuropharmacology*. 53(1): 27-36.
- Popoli M, Yan Z, McEwen BS, Sanacora G (2011) The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nat Rev Neurosci*. 13(1): 22-37.
- Proudfoot H, Baillie AJ, Teesson M (2006) The structure of alcohol dependence in the community. *Drug Alcohol Depend*. 81:21–6
- Ramcharitar V, Levine BS, Goldberger BA, Caplan YH (1992) Bupropion and alcohol fatal intoxication: case report. *Forensic Sci Int*. 56(2): 151-6.
- Rauhut AS, Mullins SN, Dwoskin LP, Bardo MT (2002) Reboxetine: attenuation of intravenous nicotine self-administration in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 303(2): 664-672.
- Ray LA , Bujarski S, Grodin E, Hartwell E, Green RM , Venegas AB, Lim ACM , Gillis AM, Miotto K M (2018) State-of-the-art behavioral and pharmacological treatments for alcohol use disorder. *Am J Drug Alcohol Abuse*. 1-17.
- Reeves DC, Lummis SC (2002) The molecular basis of the structure and function of the 5-HT 3 receptor: a model ligand-gated ion channel *Mol. Membr. Biol*. 19: 11-26.
- Reeves RR, Ladner ME (2013) Additional evidence of the abuse potential of bupropion. *J Clin Psychopharmacol*. 33: 584-585.
- Renoir T, Pang TY, Lanfumey L (2012) Drug withdrawal-induced depression: Serotonergic and plasticity changes in animal models. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 36(1): 696-726.
- Reznikov LR, Grillo CA, Piroli GG, Pasumarthi RK, Reagan LP, Fadel J (2007) Acute stress-mediated increases in extracellular glutamate levels in the rat amygdala: differential effects of antidepressant treatment. *Eur J Neurosci*. 25: 3109-3114.
- Richmond R, Zwar N (2003) Review of bupropion for smoking cessation. *Drug Alcohol Rev*. 22(2): 203-20.

- Rimondini R, Arlinde C, Sommer W, Heilig M (2002) Long-lasting increase in voluntary ethanol consumption and transcriptional regulation in the rat brain after intermittent exposure to alcohol. *FASEB J.* 16(1): 27-35.
- Roberto M, Varodayan FP (2017) Synaptic targets: Chronic alcohol actions. *Neuropharmacology.* 122: 85-99.
- Roberts E, Frankel D (1950) γ -Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. *J Biol Chem.* 187: 55-63.
- Robinson SL, Alexander NJ, Bluett RJ, Patel S, McCool BA (2015) Acute and chronic ethanol exposure differentially regulate CB1 receptor function at glutamatergic synapses in the rat basolateral amygdala. *Neuropharmacology.* 108: 474–484.
- Robinson TE, Berridge KC (1993) The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev.* 18(3):247-91.
- Roine RP, Gentry RT, Lim RT, Jr Heikkonen E, Salaspuro M, Lieber CS (1993) Comparison of blood alcohol concentrations after beer and whisky. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research.* 17: 709–711.
- Romero-Sanchiz P, Nogueira-Arjona R, Pastor A, Araos P, Serrano A, Boronat A, Garcia-Marchena N, Mayoral F, Bordallo A, Alén F, Suárez J, de la Torre R, Pavón FJ, Rodríguez de Fonseca F (2019) Plasma concentrations of oleoylethanolamide in a primary care sample of depressed patients are increased in those treated with selective serotonin reuptake inhibitor-type antidepressants. *Neuropharmacology.* 149: 212-220.
- Ross RA (2003) Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *Br J Pharmacol.* 140(5): 790–801.
- Rubio M, de Miguel R, Fernández-Ruiz J, Gutiérrez-López D, Carai MAM, Ramos JA (2009) Effects of a short-term exposure to alcohol in rats on FAAH enzyme and CB1 receptor in different brain areas. *Drug Alcohol Depend.* 99: 354–358.
- Rush AJ, Trivedi MH, Wisniewski SR, Nierenberg AA, Stewart JW, Warden D, Niederehe G, Thase ME, Lavori PW, Lebowitz BD, McGrath PJ, Rosenbaum JF, Sackeim HA, Kupfer DJ, Luther J, Fava M (2006) Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: a STAR*D report. *Am J Psychiatry.* 163: 1905–1917.

- Saha TD, Chou SP, Grant BF (2006) Toward an alcohol use disorder continuum using item response theory: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. *Psychol Med.* 36: 931–41.
- Sakharkar AJ, Vetreno RP, Zhang H, Kokare DM, Crews FT, Pandey SC (2016) A role for histone acetylation mechanisms in adolescent alcohol exposure-induced deficits in hippocampal brain-derived neurotrophic factor expression and neurogenesis markers in adulthood. *Brain Structure and Function.* 221(9): 4691-4703.
- Salaspuro MP, Lieber CS (1978) Non-uniformity of blood ethanol elimination: its exaggeration after chronic consumption. *Ann Clin Res.* 10(5): 294-7.
- Samson HH, Sharpe AL, Denning C (1999) Initiation of ethanol self-administration in the rat using sucrose substitution in a sipper-tube procedure. *Psychopharmacology.* 147: 274-279.
- Sanacora G, Treccani G, Popoli M (2012) Towards a glutamate hypothesis of depression: an emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. *Neuropharmacology.* 62(1): 63-77.
- Sánchez C, Hyttel J (1999) Comparison of the effects of antidepressants and their metabolites on reuptake of biogenic amines and on receptor binding. *Cell Mol Neurobiol.* 19(4): 467-89.
- Sánchez-Marin L, Pavón FJ, Decara J, Suarez J, Gavito A, Castilla-Ortega E, Rodriguez de Fonseca F, Serrano A (2017) Effects of Intermittent Alcohol Exposure on Emotion and Cognition: A Potential Role for the Endogenous Cannabinoid System and Neuroinflammation. *Front Behav Neurosci.* 11: 15.
- Sanchis-Segura C, Borchardt T, Vengeliene V, Zghoul T, Bachteler D, Gass P, Sprengel R, Spanagel R (2006) Involvement of the AMPA receptor GluR-C subunit in alcohol-seeking behavior and relapse. *J Neurosci.* 26(4): 1231-8.
- Sapolsky RM (1996) Stress, glucocorticoids, and damage to the nervous system: The current state of confusion. *Stress.* 1: 1-19.
- Scarante FF, Vila-Verde C, Detoni VL, Ferreira-Junior NC, Guimarães FS, Campos AC (2017) Cannabinoid Modulation of the Stressed Hippocampus. *Front Mol Neurosci.* 10: 411.

- Schildkraut JJ (1965) The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry*. 122(5): 509-22.
- Schildkraut JJ (1995) The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. 1965. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 7(4): 524-33.
- Schuckit MA (1985) The Clinical Implications of Primary Diagnostic Groups Among Alcoholics. *Arch Gen Psychiatry*. 42 (11): 1043 -9.
- Schuckit MA (2006) Comorbidity between substance use disorders and psychiatric conditions. *Addiction*. 101: 76-8.
- Schuckit MA, Tipp JE, Bergman M, Reich W, Hesselbrock VM, Smith TL (1997) Comparison of induced and independent major depressive disorders in 2,945 alcoholics . *Am J Psychiatry*. 154 (7): 948-957.
- Sebe JY, Eggers ED, Berger AJ (2003) Differential effects of ethanol on GABAA and glycine receptor-mediated synaptic currents in brain stem motoneurons. *Journal of Neurophysiology*. 90: 870-875.
- Serrano A, Pavón FJ, Buczynski MW, Schlosburg J, Natividad LA, Polis IY, Stouffer DG, Zorrilla EP, Roberto M, Cravatt BF, Martin-Fardon R, Rodriguez de Fonseca F, Parsons LH (2018) Deficient endocannabinoid signaling in the central amygdala contributes to alcohol dependence-related anxiety-like behavior and excessive alcohol intake. *Neuropsychopharmacology*. 43(9): 1840-1850.
- Serrano A, Rivera P, Pavón FJ, Decara J, Suarez J, Rodriguez de Fonseca F, Parsons LH (2012) Differential effects of single versus repeated alcohol withdrawal on the expression of endocannabinoid system-related genes in the rat amygdala. *Alcohol Clin Exp Res*. 36: 984–994.
- Shaw DM, Camps FE, Eccleston EG (1967) 5-Hydroxytryptamine in the hind-brain of depressive suicides. *Br J Psychiatry*. 113(505): 1407-11.
- Shulman KI, Herrmann N, Walker SE (2013) Current place of monoamine oxidase inhibitors in the treatment of depression. *CNS Drugs*. 27(10): 789-97.
- Sills GJ (2006) The mechanisms of action of gabapentin and pregabalin. *Curr Opin Pharmacol*. 6(1): 108–13.
- Simon O'Brien E, Legastelois R, Houchi H, Vilpoux C, Alaux-Cantin S, Pierrefiche O, André E, Naassila M (2011) Fluoxetine, desipramine, and the dual

- antidepressant milnacipran reduce alcohol self-administration and/or relapse in dependent rats. *Neuropsychopharmacology*. 36: 1518-1530.
- Simonyi A, Christian MR, Sun AY, Sun GY (2004) Chronic ethanol-induced subtype- and subregion-specific decrease in the mRNA expression of metabotropic glutamate receptors in rat hippocampus. *Alcohol Clin Exp Res*. 28(9): 1419-23.
- Skelly MJ, Weiner JL (2014) Chronic treatment with prazosin or duloxetine lessens concurrent anxiety-like behavior and alcohol intake: Evidence of disrupted noradrenergic signaling in anxiety-related alcohol use. *Brain and Behavior*. 4(4): 468-483.
- Skogen JC, Knudsen AK, Hysing M, Wold B, Sivertsen B (2016) Trajectories of alcohol use and association with symptoms of depression from early to late adolescence: The Norwegian Longitudinal Health Behaviour Study. *Drug Alcohol Rev*. 35(3): 307-16.
- Sliedrecht W, Waartb R Witkiewitzc K Roozend HG (2019) Alcohol use disorder relapse factors: A systematic review. *Psychiatry Research*. 278: 97-115.
- Smaga I, Bystrowska B, Gawliński D, Pomierny B, Stankowicz P, Filip M (2014) Antidepressants and changes in concentration of endocannabinoids and N-acylethanolamines in rat brain structures. *Neurotox Res*. 26(2): 190-206.
- Smaga I, Jastrzębska J, Zaniewska M, Bystrowska B, Gawliński D, Faron-Górecka A, Broniowska Ż, Miszkiel J, Filip M (2017a) Changes in the Brain Endocannabinoid System in Rat Models of Depression. *Neurotox Res*. 31(3): 421–435.
- Smaga I, Zaniewska M, Gawliński D, Faron-Górecka A, Szafrński P, Cegła M, Filip M (2017b) Changes in the cannabinoids receptors in rats following treatment with antidepressants. *Neurotoxicology*. 63: 13-20.
- Smothers CT, Mrotek JJ, Lovinger DM (1997) Chronic ethanol exposure leads to a selective enhancement of N-methyl-D-aspartate receptor function in cultured hippocampal neurons. *J Pharmacol Exp Ther*. 283(3): 1214-22.
- Snyder JS (2019) Recalibrating the Relevance of Adult Neurogenesis. *Trends Neurosci*. 42(3): 164-178.
- Solomon RL, Corbit, JD (1974) An opponent-process theory of motivation: 1. Temporal dynamics of affect. *Psychological Review*. 81: 119–145.

- Somkuwar SS, Fannon MJ, Staples MC, Zamora-Martinez ER, Navarro AI, Kim A, Quigley JA, Edwards S, Mandyam CD (2016) Alcohol dependence-induced regulation of the proliferation and survival of adult brain progenitors is associated with altered BDNF-TrkB signaling. *Brain Structure & Function*. 221(9): 4319-4335.
- Song L, Wang H, Wang YJ, Wang JL, Zhu Q, Wu F, Zhang W, Jiang B (2018) Hippocampal PPAR α is a novel therapeutic target for depression and mediates the antidepressant actions of fluoxetine in mice. *Br J Pharmacol*. 175(14): 2968-2987.
- Soroko FE, Maxwell RA (1983) The pharmacologic basis for therapeutic interest in bupropion. *J Clin Psychiatry*. 44(5 Pt 2): 67-73.
- Soyka M, Koller G, Schmidt P, Lesch OM, Leweke M, Fehr C, Gann H, Mann KF, ACTOL Study Investigators (2008) Cannabinoid receptor 1 blocker rimonabant (SR 141716) for treatment of alcohol dependence: results from a placebo-controlled, double-blind trial. *J Clin Psychopharmacol*. 28(3): 317-24.
- Soyka M, Müller CA (2017) Pharmacotherapy of alcoholism—An update on approved and off-label medications. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 18(12): 1187-1199.
- Spalding KL, Bergmann O, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Huttner HB, Boström E, Westerlund I, Vial C, Buchholz BA, Possnert G, Mash DC, Druid H, Frisén J (2013) Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell*. 153(6): 1219–1227.
- Stahl SM, Pradko JF, Haight BR, Modell JG, Rockett CB, Learned-Coughlin S (2004) A Review of the Neuropharmacology of Bupropion, a Dual Norepinephrine and Dopamine Reuptake Inhibitor. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry*. 6(4): 159–166.
- Stawski P, Janovjak H, Trauner D (2010) Pharmacology of ionotropic glutamate receptors: A structural perspective. *Bioorg Med Chem*. 18(22): 7759-72.
- Stevenson JR, Schroeder JP, Nixon K, Besheer J, Crews FT, Hodge CW (2009) Abstinence following alcohol drinking produces depression-like behavior and reduced hippocampal neurogenesis in mice. *Neuropsychopharmacology*. 34: 1209-1222
- Suárez J, Khom S, Alén F, Natividad LA, Varodayan FP, Patel RR, Kirson D, Arco R, Ballesta A, Bajo M, Rubio L, Martin-Fardon R, Rodríguez de Fonseca F, Roberto

- M (2019) Cessation of fluoxetine treatment increases alcohol seeking during relapse and dysregulates endocannabinoid and glutamatergic signaling in the central amygdala. *Addiction biology*. *in press*.
- Sullivan LE, Fiellin DA, O'Connor PG (2005) The prevalence and impact of alcohol problems in major depression: a systematic review. *American Journal of Preventive Medicine*. 118: 330-341.
- Sun Y, Alexander SPH, Kendall DA, Bennett AJ (2006) Cannabinoids and PPAR α signalling. *Biochemical Society Transactions*. 34(6): 1095–1097.
- Suter M, Strik W, Moggi F (2011) Depressive symptoms as a predictor of alcohol relapse after residential treatment programs for alcohol use disorder. *Journal of Substance Abuse Treatment*. 41(3): 225-232.
- Takashima Y, Mandyam CD (2018) The role of hippocampal adult neurogenesis in methamphetamine addiction. *Brain Plast*. 3(2): 157–168.
- Tam TW, Mulia N, Schmidt LA. (2014) Applicability of Type A/B alcohol dependence in the general population. *Drug Alcohol Depend*. 138: 169–176.
- Tanti A, Belzung C (2013) Hippocampal neurogenesis: A biomarker for depression or antidepressant effects? Methodological considerations and perspectives for future research. *Cell and Tissue Research*. 354(1): 203-219.
- Tokarski K, Bobula B, Wabno J, Hess G (2008) Repeated administration of imipramine attenuates glutamatergic transmission in rat frontal cortex. *Neuroscience*. 153: 789-795.
- Torrens M, Fonseca F, Mateu G, Farré M (2005) Efficacy of antidepressants in substance use disorders with and without comorbid depression. A systematic review and meta-analysis. *Drug and Alcohol Dependence*. 78(1): 1-22.
- Trullas R, Skolnick P (1990) Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. *Eur J Pharmacol*. 185: 1-10.
- Tsou K, Brown S, Sanudo-Pena MC, Mackie K, Walker JM (1998) Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience*. 83: 393–411.
- Tsutsumi M, Lasker JM, Takahashi T, Lieber CS (1993) In vivo induction of hepatic P4502E1 by ethanol: role of increased enzyme synthesis. *Arch Biochem Biophys*. 304: 209–218.

- Tu Y, Kroener S, Abernathy K, Lapish C, Seamans J, Chandler LJ, Woodward JJ (2007) Ethanol inhibits persistent activity in prefrontal cortical neurons. *J Neurosci.* 27(17): 4765–4775.
- Van Bockstaele EJ (2012) Cannabinoid receptor signaling and modulation of monoamines: implications for psychiatric and neurological disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 38(1): 1–3.
- Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, Stella N, Makriyannis A, Piomelli D, Davison JS, Marnett LJ, Di Marzo V, Pittman QJ, Patel KD, Sharkey KA (2005) Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science.* 310: 329–332.
- Vengeliene V, Bilbao A, Molander A, Spanagel R (2008) Neuropharmacology of alcohol addiction. *Br J Pharmacol.* 154(2): 299-315.
- Vengeliene V, Bilbao A, Spanagel R (2014) The alcohol deprivation effect model for studying relapse behavior: a comparison between rats and mice. *Alcohol.* 48(3): 313-20.
- Vetreno RP, Lawrimore CJ, Rowsey PJ, Crews FT (2018) Persistent adult neuroimmune activation and loss of hippocampal neurogenesis following adolescent ethanol exposure: Blockade by exercise and the anti-inflammatory drug indomethacin. *Frontiers in Neuroscience.* 12.
- Vinod KY, Arango V, Xie S, Kassir SA, Mann JJ, Cooper TB, Hungund BL (2005) Elevated levels of endocannabinoids and CB1 receptor-mediated G-protein signaling in the prefrontal cortex of alcoholic suicide victims. *Biol Psychiatry.* 57(5): 480-6.
- Vinod KY, Kassir SA, Hungund BL, Cooper TB, Mann JJ, Arango V (2010) Selective alterations of the CB1 receptors and the fatty acid amide hydrolase in the ventral striatum of alcoholics and suicides. *J Psychiatr Res.* 44(9): 591-7.
- Vinod KY, Yalamanchili R, Xie S, Cooper TB, Hungund BL (2006) Effect of chronic ethanol exposure and its withdrawal on the endocannabinoid system. *Neurochem Int.* 49(6): 619-25.
- Viveros MP, Marco EM, Llorente R, López-Gallardo M (2007) Endocannabinoid system and synaptic plasticity: implications for emotional responses. *Neural Plast.* 2007: 52908.

- Vranjkovic O, Winkler G, Winder DG (2018) Ketamine administration during a critical period after forced ethanol abstinence inhibits the development of time-dependent affective disturbances. *Neuropsychopharmacology*. 43(9): 1915-1923.
- Ward RJ, Colivicchi MA, Allen R, Schol F, Lallemand F, de Witte P, Ballini C, Corte LD, Dexter D (2009) Neuro-inflammation induced in the hippocampus of 'binge drinking' rats may be mediated by elevated extracellular glutamate content. *J Neurochem*. 111(5): 1119-28.
- Warnock KT, Yang AR, Yi HS, June HL Jr, Kelly T, Basile AS, Skolnick P, June HL (2012) Amitifadine, a triple monoamine uptake inhibitor, reduces binge drinking and negative affect in an animal model of co-occurring alcoholism and depression symptomatology. *Pharmacol Biochem Behav*. 103(1): 111-8.
- Watkins JC, Jane DE (2006) The glutamate story. *Br J Pharmacol*. 147 (1): 100–108.
- Watson PE (1989) Total body water and blood alcohol levels: Updating the fundamentals. En: Crow KE, Batt RD (Eds), *Human Metabolism of Alcohol*. 1: 41–56. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Weissman IL, Anderson DJ, Gage F (2001) Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 17: 387-403.
- White HS, Brown SD, Woodhead JH, Skeen GA, Wolf HH (2000) Topiramate modulates GABA-evoked currents in murine cortical neurons by a nonbenzodiazepine mechanism. *Epilepsia*. 41 (1): 17-20.
- WHO (2017) World Health Organization. Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates 2017. Licence: CC BY-NC-SA3.0 IGO.
- WHO (2018) World Health Organization. Global status report on alcohol and health 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Wilson AW, Costall B, Neill JC (2000) Manipulation of operant responding for an ethanol-paired conditioned stimulus in the rat by pharmacological alteration of the serotonergic system. *Journal of Psychopharmacology*. 14(4): 340–346.
- Wong DT, Bymaster FP, Horng JS, Molloy BB (1975) A new selective inhibitor for uptake of serotonin into synaptosomes of rat brain: 3-(p-trifluoromethylphenoxy)-N-methyl-3-phenylpropylamine. *J Pharmacol Exp Ther*. 193(3): 804-11.

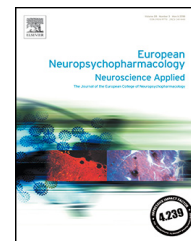
- Wong DT, Horng JS, Bymaster FP, Hauser KL, Molloy BB (1974) A selective inhibitor of serotonin uptake: Lilly 110140, 3-(p-trifluoromethylphenoxy)-N-methyl-3-phenylpropylamine. *Life Sci.* 15(3): 471-9.
- Woodward Hopf F, Mangieri RA (2018) Do Alcohol-Related AMPA-Type Glutamate Receptor Adaptations Promote Intake? En: Grant K, Lovinger D (Eds), *The Neuropharmacology of Alcohol. Handbook of Experimental Pharmacology*, vol 248. Cham: Springer.
- Wright JM, Peoples RW, Weight FF (1996) Single-channel and whole-cell analysis of ethanol inhibition of NMDA-activated currents in cultured mouse cortical and hippocampal neurons. *Brain Res.* 738: 249–56.
- Xu C, Loh HH, Law PY (2015) Effects of addictive drugs on adult neural stem/progenitor cells. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 73(2): 327-348.
- Yamakura T, Shimoji K (1999) Subunit- and site-specific pharmacology of the NMDA receptor channel. *Prog Neurobiol.* 59: 279-98.
- Yamamoto B, Reagan LP (2006) The glutamatergic system in neuronal plasticity and vulnerability in mood disorders. *Neuropsych Dis Treat.* 2 (2): 7-14.
- Yashiro K, Philpot BD (2008) Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity. *Neuropharmacology.* 55(7): 1081–1094.
- Zeise ML, Kasparov S, Capogna M, Zieglgänsberger W (1993) Acamprosate (calciumacetylhomotaurinate) decreases postsynaptic potentials in the rat neocortex: possible involvement of excitatory amino acid receptors. *Eur J Pharmacol.* 231 (1): 47–52.
- Zhang HY, Gao M, Shen H, (2016) Expression of functional cannabinoid CB2 receptor in VTA dopamine neurons in rats. *Addict Biol.* 22(3): 752-765.
- Zhang Y, Zhou X, Pu J, Zhang H, Yang L, Liu L, Zhou C, Yuan S, Jiang X, Xie P (2018) Antidepressants for depressive disorder in children and adolescents: a database of randomised controlled trials. *BMC Psychiatry.* 18(1): 162.
- Zhou Y, Schwartz BI, Giza J, Gross SS, Lee FS, Kreek MJ (2017) Blockade of alcohol escalation and "relapse" drinking by pharmacological FAAH inhibition in male and female C57BL/6J mice. *Psychopharmacology (Berl).* 234(19): 2955–2970.

- Zimmermann T, Maroso M, Beer A, Baddenhausen S, Ludewig S, Fan W, Vennin C, Loch S, Berninger B, Hofmann C, Korte M, Soltesz I, Lutz B, Leschik J (2018) Neural stem cell lineage-specific cannabinoid type-1 receptor regulates neurogenesis and plasticity in the adult mouse hippocampus. *Cereb Cortex*. 28(12): 4454–4471.
- Zou S, Kumar U (2018) Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System. *Int J Mol Sci*. 19(3): 833.
- Zucca S, Valenzuela CF (2010) Low concentrations of alcohol inhibit BDNF-dependent GABAergic plasticity via L-type Ca^{2+} channel inhibition in developing CA3 hippocampal pyramidal neurons. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 30: 6776–81.

11. ANEXO

ANEXO 1

Ballesta A, Orio L, Arco R, Vargas A, Romero-Sanchiz P, Nogueira-Arjona R, de Heras RG, Antón M, Ramírez-López M, Serrano A, Pavón FJ, de Fonseca FR, Suárez J, Alen F (2019) **Bupropion, a possible antidepressant without negative effects on alcohol relapse.** *Eur Neuropsychopharmacol.* 29(6): 756-765.



Bupropion, a possible antidepressant without negative effects on alcohol relapse



Antonio Ballesta^a, Laura Orio^a, Rocío Arco^b, Antonio Vargas^b,
Pablo Romero-Sanchiz^{b,c,d}, Raquel Nogueira-Arjona^{c,e},
Raquel Gómez de Heras^a, María Antón^a,
Mayte Ramírez-López^a, Antonia Serrano^b,
Francisco Javier Pavón^b, Fernando Rodríguez de Fonseca^{a,b,*},
Juan Suárez^{b,**}, Francisco Alen^{a,b,*}

^aDepartamento de Psicobiología y Metodología en Ciencias del Comportamiento, Facultad de Psicología, Universidad Complutense de Madrid, 28224 Spain

^bLaboratorio de Medicina Regenerativa, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), UGC Salud Mental, Hospital Regional Universitario de Málaga, Av. Carlos Haya 82, sótano, Málaga 29010, Spain

^cUnidad de Salud Mental, Hospital Universitario Regional de Málaga, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Spain

^dDepartamento de Personalidad, Evaluación y Tratamientos Psicológicos. Universidad de Málaga, Málaga, Spain

^eDepartment of Psychology and Neuroscience, Dalhousie University, Canada.

Received 27 November 2018; received in revised form 4 March 2019; accepted 27 March 2019

KEYWORDS

Alcohol;
Prefrontal cortex;
Antidepressant;
Cannabinoid;
Glutamate;
Relapse

Abstract

Rationale: the role that antidepressants play on alcohol consumption is not well understood. Previous studies have reported that treatment with a Selective Serotonin Reuptake Inhibitor (SSRIs) increases alcohol consumption in an animal model of relapse, however it is unknown whether this effect holds for other antidepressants such as the atypical dopamine/norepinephrine reuptake inhibitors (SNDRI).

Objectives: the main goal of the present study was to compare the effects of two classes of antidepressants drugs, bupropion (SNDRI) and fluoxetine (SSRI), on alcohol consumption during

* Corresponding authors at: Laboratorio de Medicina Regenerativa, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), UGC Salud Mental, Hospital Regional Universitario de Málaga, Av. Carlos Haya 82, sótano, Málaga 29010, Spain.

** Corresponding author.

E-mail addresses: fernando.rodriguez@ibima.eu (F.R. de Fonseca), juan.suarez@ibima.eu (J. Suárez), p_alen@yahoo.es, f.alen@psi.ucm.es (F. Alen).

relapse. Since glutamatergic and endocannabinoid signaling systems play an important role in alcohol abuse and relapse, we also evaluated the effects of both antidepressants on the expression of the main important genes and proteins of both systems in the prefrontal cortex, a critical brain region in alcohol relapse.

Methods: rats were trained to self-administered alcohol. During abstinence, rats received a 14d-treatment with vehicle, fluoxetine (10 mg/kg) or bupropion (20 mg/kg), and we evaluated alcohol consumption during relapse for 3 weeks. Samples of prefrontal cortex were taken to evaluate the mRNA and protein expression of the different components of glutamatergic and endocannabinoid signaling systems.

Results: fluoxetine treatment induced a long-lasting increase in alcohol consumption during relapse, an effect that was not observed in the case of bupropion treatment. The observed increases in alcohol consumption were accompanied by distinct alterations in the glutamate and endocannabinoid systems.

Conclusions: our results suggest that SSRIs can negatively impact alcohol consumption in relapse while SNDRIs have no effects. The observed increase in alcohol consumption are accompanied by functional alterations in the glutamatergic and endocannabinoid systems. This finding could open new strategies for the treatment of depression in patients with alcohol use disorders.

© 2019 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Alcohol is the most consumed psychoactive substance in the world and in European countries including Spain, where the last 12 months prevalence of use in the population from 15 to 64 years of age was 94.1% (Drogas 2016; Winstock 2017). It is known that alcohol is associated with depression in humans, and depression-like symptoms can be found in animals chronically exposed to ethanol (Fergusson et al., 2009; Hauser et al., 2011; Pietraszek et al., 1991). In addition, primary depression is considered to predispose to alcohol consumption (Khantzian 1997; Paré et al., 1999). In consonance with that, a great number of alcohol use disorder (AUD) patients complain from depressive symptoms (Davidson 2018; Naranjo and Knoke 2001; Schuckit et al., 1997) and around 46% of them are prescribed antidepressant treatment (Mark et al., 2003). However, a relevant number of these patients relapse to alcohol use and, since it is advised to avoid combining alcohol and antidepressants, most of them discontinue antidepressant treatment during relapse (Haw and Stubbs 2011). Although initial studies suggest that Selective Serotonin Reuptake Inhibitors (SSRIs), the most commonly used class of antidepressants, reduce alcohol consumption in heavy drinkers by 15–20% (Naranjo and Bremner 1993), subsequent placebo controlled trials have not found a reduction in alcohol drinking (Kranzler et al., 1995). Moreover, several studies suggest a possible negative role of antidepressant treatment on alcohol consumption since some depressed patients show an enhanced craving for alcohol or develop alcohol-dependence after using these drugs (Atigari et al., 2013; Brookwell et al., 2014; Charney et al., 2015; Menkes and Herxheimer 2014).

The variability in clinical trials as well as in the mentioned clinical studies may be explained by hidden variables, such as the heterogeneity of the antidepressants used in the studies, which display different pharmacological mechanisms (Torrens et al., 2005).

The potential negative effects of antidepressant treatment cessation on alcohol relapse have been explored in preclinical models. Previous studies have identified that

antidepressant cessation-induced increased vulnerability to alcohol consumption and relapse. This increased vulnerability has been observed using antidepressants with different mechanisms of action. We observed that fluoxetine, an SSRI with no appreciable effects on norepinephrine or dopamine uptake, when administered sub-chronically increased alcohol consumption in relapse, an effect that also held for venlafaxine, a mixed serotonin/noradrenaline reuptake inhibitor. This effect was of a more shorter lived when atomoxetine, a norepinephrine/dopamine reuptake inhibitor was used (Alen et al. 2014a, 2014b). These results indicate that antidepressants with different pharmacological profiles might have different impact on alcohol relapse. Antidepressants based on the blockade of dopamine uptake, such as bupropion, are not common in therapeutics, but they might offer an innovative opportunity for avoiding these unwanted effects.

In this context, the main aim of the present study was to compare the effects of bupropion a selective dopamine and norepinephrine reuptake inhibitor with no serotonergic activity (Wilkes 2008) with that of the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine on alcohol relapse, taking in consideration that this SSRI dramatically increased alcohol relapse in animal models (Alen et al. 2014a).

Because growing evidence suggests that alterations of both glutamatergic and endocannabinoid systems in the prefrontal cortex (PFC) may contribute to excessive alcohol consumption during relapse (Cippitelli et al., 2005; Eisenhardt et al., 2015; Hansson et al. 2007; Hermann et al. 2012; Karlsson et al. 2012), we also assessed the expression of selected genes and proteins related to glutamate and endocannabinoid function in this brain area. The PFC is a brain region that receives extensive projections from ascending mesolimbic dopaminergic neurons, as well as serotonergic input. Thus, PFC might be a crucial brain area to analyze the impact of either bupropion or fluoxetine treatment along a 2-week withdrawal period following relapse (Farley et al., 2012; Zarate et al., 2008). In addition to the involvement of both glutamatergic and endocannabinoid systems in AUD, both signaling systems play a critical role in mood disorders

(Hwa et al., 2017; Rodríguez-Muñoz et al., 2016; Trullas and Skolnick 1990). Thus, the characterization of the effects of these different antidepressants on alcohol relapse as well as their effects on glutamatergic and endocannabinoid systems in the PFC might help to understand why the association of depression and AUD is a severe clinical complication with poor therapeutic outcomes.

2. Experimental procedures

2.1. Animals

Considering that drugs that are used to treat mental disorders are best studied in animal models of the disorder (Russell et al., 2005; Soeters et al., 2008), rats were exposed to a passive model of depression, based on isolation, which is considered to have greater etiological validity than those based on lesions or monoamine depletion (Barrot et al. 2005; Deussing 2006; Willner 1991). According to this, rats were single-housed from adolescence up to the time of the experiment. Twenty-four adult male Wistar rats (8 per group) (ENVIGO, Barcelona, Spain), kept under a 12-h light/dark cycle (lights off at 12:00 p.m.) in a room at constant temperature ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) and weighted 375–425 g at the beginning of the experiments. Standard food and tap water were available *ad-libitum* at the home-cage. All experimental animal procedures were performed in compliance with the European Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes and with Spanish regulations (RD 53/2013 and 178/2004). All protocols were approved by the Ethics Committee of the Universidad Complutense de Madrid. Special care was taken to minimize the suffering and number of animals to achieve our research goals.

2.2. Drugs

Bupropion HCl was purchased from Sandoz (Spain). Fluoxetine HCl was obtained from Eli Lilly (Spain). Bupropion and fluoxetine solutions were prepared daily by dissolving in 0.9% saline, and were injected intraperitoneally (i.p.) at a dose of 20 mg/kg (bupropion) and 10 mg/kg (fluoxetine) in a volume of 2 mL/kg as previously described (Alen et al. 2014a; Hall et al., 2015). Alcohol solution (10% ethanol w/v solution) was prepared daily from 99% ethanol.

2.3. Alcohol self-administration and relapse model

We used an alcohol relapse model based on the alcohol deprivation effect, which is considered to have excellent face and predictive validity in relation to alcohol consumption (Vengeliene et al., 2014). Then, all the animals were trained to lever-press for alcohol self-administration for the same amount of time, and, after they had reached a steady level of self-administration (less than 15% variation in 2 consecutive days), they were sub-chronically treated with fluoxetine or bupropion. After that, antidepressant treatment ceased, and alcohol self-administration sessions were re-introduced and changes in the patterns of alcohol consumption were monitored for three consecutive weeks.

Specifically, animals were trained to self-administer alcohol in operant chambers (Leticia, LE 850 model; Panlab, Barcelona, Spain) enclosed in sound-attenuating boxes and fitted with an exhaust fan. The chambers were equipped with two retractable levers (one being the active lever, and the other being the inactive lever), located on either side of a drinking dipper. The side of the active lever was counterbalanced between sessions to avoid development of location preferences. Pressing the active lever

resulted in the delivery of 0.1 mL of the solution, which was present to the animal followed by a 2.5 s. time-out, while pressing of the inactive lever had no consequences. All the alcohol operant sessions lasted 30 min per day over 5 days/week (Monday to Friday) schedule for the entire study. The number of responses and dipper presentations in both levers were registered automatically by computer software. Animals were weighed daily before the alcohol self-administration sessions. Training was carried out using a modification of the traditional saccharine fading procedure (Samson et al., 1999) described in Alen et al. (2009). Once saccharine is eliminated, ethanol can reinforce lever presses in the same way as other reinforcers and, indeed, sucrose self-administration in the later phases of the procedure has been found to be unrelated to saccharine self-administration (Rogowski et al., 2002; Samson and Czachowski 2003). During the first 3 days of training, the animals received 0.2% saccharin solution in the dipper to facilitate the acquisition of lever pressing. Thereafter, the following sequence on a fixed-ratio 1 schedule was used: 0.16% saccharine and 2% alcohol for three sessions, 0.12% saccharine and 4% alcohol for three sessions, 0.08% saccharine and 6% alcohol for four sessions, 0.04% saccharine and 8% alcohol for four sessions, 0.02% saccharine plus 10% alcohol, and finally 10% alcohol alone for the rest of sessions. The experiments began once a relatively constant level of alcohol consumption had been reached, following a period of at least 6 weeks of access to alcohol (10% w/v). Then, the 24 animals were randomly assigned to one of the three experimental groups: 1) vehicle; 2) bupropion (20 mg/kg); 3) fluoxetine (10 mg/kg), receiving the corresponding treatment for 14 days. After that, animals were let to rest for a period of 24 h, and then the daily 30 min. ethanol self-administration sessions were reintroduced and monitored. See Fig. 1(A) for a schematic representation of the experimental procedure.

2.4. Tissue collection

One hour after the last alcohol self-administration session, all animals were euthanized by decapitation and their brains were immediately dissected out, frozen on dry ice, and stored at -80°C . The brains were dissected in 2-mm thick coronal brain slices on dry ice using razor blades and a rat brain slicer matrix (Zivic Instruments, Pittsburgh, PA, USA). The medial prefrontal cortex (mPFC or prelimbic cortex) was precisely removed from Bregma 4.70 mm to 2.20 mm with fine surgical instruments (Paxinos and Franklin 2004). The samples were stored at -80°C until further use for gene and protein analyses.

2.5. RNA isolation and RT-qPCR analysis

Real-time PCR was used to quantify the relative mRNA levels of different receptors, transporters, and synthesis/degradation enzymes involved in the glutamatergic [liver-type glutaminase isoforms (LGA or GLS2), kidney-type glutaminase isoforms (KGA or GLS1), metabotropic receptors (mGlu3/5), ionotropic glutamate N-methyl D-aspartate (NMDA) receptor subunits (GluN1/2A/2B/2C), ionotropic glutamate α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (Birch et al.) receptor subunits (GluA1/2/3/4), and the glutamate transporter (Slc1a1 or EAAC1)] and endocannabinoid [cannabinoid receptor type 1 (CB₁) and cannabinoid receptor type 2 (CB₂), peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR- α) and peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ); N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D (NAPE-PLD), diacyl-glycerol lipase α/β (DAGL α/β), fatty acid amide hydrolase (FAAH), and monoacylglycerol lipase (MAGL)] signaling.

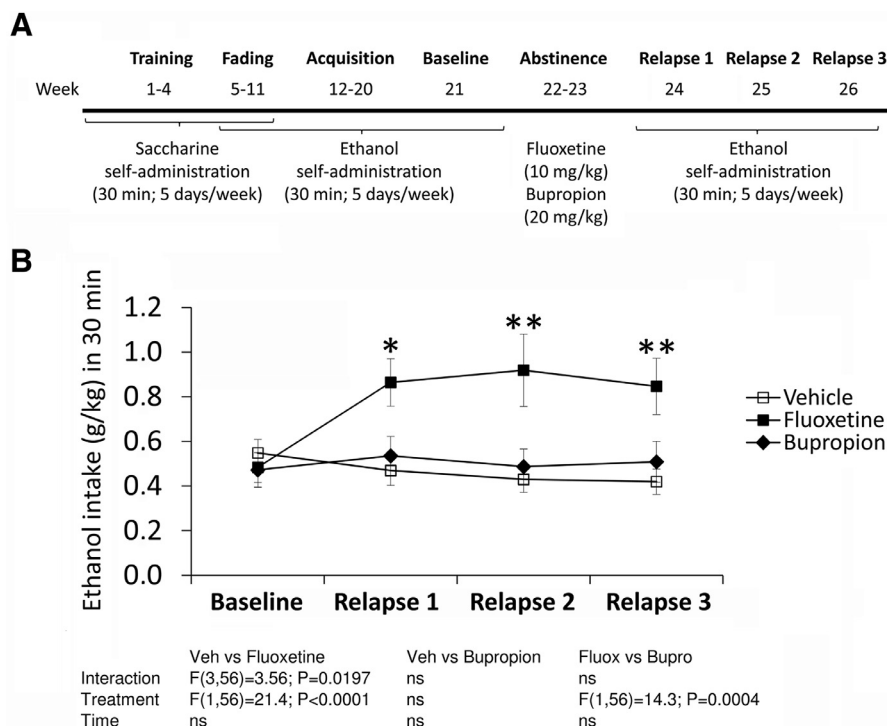


Fig. 1 Experimental design of the model of ethanol consumption and treatment with fluoxetine and bupropion during ethanol deprivation (A). Weekly average of ethanol intake by operant self-administration in the rats treated with vehicle, fluoxetine and bupropion along three consecutive weeks (B). Data are the average (5-days) of daily ethanol intake, \pm SEM ($n=8$). *Post hoc* analysis: #/## $p<0.05/0.01$ vs. baseline of their respective group; */** $p<0.05/0.01$ vs. vehicle group.

We performed real-time PCR (TaqMan, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) as described previously (Serrano et al., 2012) using specific sets of primer probes from TaqMan® Gene Expression Assays (Table S1). Total RNA was extracted from mPFC samples using Trizol® method, according the manufacturer's instructions (ThermoFisher Scientific). RNA samples were isolated with RNAeasy minelute cleanup-kit including digestion with DNase I column (Qia-gen, Hilden, Germany) and quantified using a spectrophotometer to ensure A260/280 ratios of 1.8–2.0. After the reverse transcript reaction from 1 μ g of mRNA, a quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (qPCR) was performed in a CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and the FAM dye labeled format for the TaqMan® Gene Expression Assays (ThermoFisher Scientific). A melting curve analysis was performed to ensure that only a single product was amplified. After analyzing several control genes, values obtained from the brain samples were normalized in relation to β -actin gene (*Actb*) levels, which was found not to vary significantly between groups.

2.6. Western blot analysis

Western blotting was used to measure the protein levels of the endocannabinoid-related signaling system and the glutamate receptors GluN1, GluA1 and mGlu5 in the mPFC as previously described (Suarez et al., 2008). The samples were homogenized in 50 mM Hepes buffer (pH 8) and 0.32 M sucrose buffer to obtain the membrane protein extracts. For immunoblotting, the protein samples (40 μ g) were separated on 10% (w/v) SDS-PAGE gels, transferred to nitrocellulose membranes (BioRad, Hercules, CA, USA) and controlled by Ponceau Red staining. After blocking with 5% (w/v) bovine serum albumin in PBST (0.1% Tween 20

in PBS) at room temperature for 1 h, the membranes were incubated with the following primary antibodies overnight at 4 °C: anti-CB₁ (#ab23703, Abcam, 1:200), anti-CB₂ (#ab3561, Abcam, 1:200), anti-PPAR α (#RDI-PPARAabrx, Fitzgerald, 1:500), anti-PPAR γ (#sc-7273, Santa Cruz, 1:100), anti-DAGL α (1:100), anti-DAGL β (1:50), anti-MAGL (Cayman, 100035, 1:200), GluN1 (#M-207, Sigma-Aldrich, 1:100), GluR1 (#PA5-77416, ThermoFisher, 1:200), and mGluR5 (#PA1-24637, ThermoFisher, 1:500) (see Table S2 for further information). A HRP-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG (H + L) secondary antibodies (Promega, Madison, WI, USA) diluted 1:10,000 was added for 1 h at room temperature. The specific protein bands were visualized and quantified by chemiluminescence using an imaging AutoChem™ UVP BioImaging System (LTF Labortechnik, Bodensee, Germany). β -actin was quantified and used as a loading control (anti- β -actin diluted 1:1000 from Sigma-Aldrich, cat. no. A5316).

2.7. Data analysis

Data are means \pm SEM ($n=8$ /group for behavior; $n=6-8$ /group for mRNA analysis; $n=3$ /group for protein analysis). The operant alcohol self-administration results were analyzed by means of a two-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measures (time and treatment as factors), and multiple comparison *post-hoc* test (Bonferroni) when appropriate. Regarding mRNA and protein levels, results were also analyzed using a one-way ANOVA, and multiple comparison *post-hoc* test (Bonferroni) when appropriate. The statistical analysis of all results was performed using the computer program GraphPad Prism v6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A p -value less than 0.05 was considered to be statistically significant.

3. Results

3.1. Effects of bupropion and fluoxetine on weekly alcohol self-administration after relapse

After achieving a relatively constant level of active lever pressing and alcohol self-administration during the last week of acquisition period (baseline), rats were exposed to an alcohol deprivation period of 14 days (Fig. 1(A)). During alcohol deprivation, rats were daily treated with vehicle, bupropion or fluoxetine. The general repeated measures ANOVA indicated a treatment effect on ethanol self-administration in fluoxetine-treated rats ($F_{1,56}=21.4$, $p<0.0001$) after relapse for 3 weeks (Fig. 1(B)). No treatment effect on ethanol self-administration was found in bupropion-treated rats. Interaction between time and treatment was also observed in the fluoxetine-treated rats ($F_{3,56}=3.56$, $p=0.019$), indicating that fluoxetine affected differently ethanol self-administration along the 3 weeks of relapse. *Post hoc* analysis showed an increase in the weekly average of ethanol consumption in fluoxetine-treated rats in the first week ($*p<0.05$), the second week ($**p<0.01$) and the third week ($**p<0.01$) of relapse compared to vehicle-treated rats (Fig. 1(B)). When they were compared to baseline levels of ethanol consumption, fluoxetine also increased ethanol self-administration along the 3 weeks after relapse ($###p<0.05/0.01$; Fig. 1(B)). No baseline changes in ethanol intake by self-administration were found in the bupropion group. No differences were found in inactive-lever pressing when compared to the different groups.

3.2. Effects of bupropion and fluoxetine on mRNA levels of endocannabinoid system-related components in mPFC

One-way ANOVA indicated significant changes in the mRNA levels of *Cnr2* ($F_{2,19}=4.59$; $p=0.023$), *Ppar α* ($F_{2,19}=3.37$; $p=0.043$), *Nape-pld* ($F_{2,19}=5.38$; $p=0.014$), *Dagl α* ($F_{2,19}=5.99$; $p=0.009$) and *Dagl β* ($F_{2,19}=4.34$; $p=0.027$) in the mPFC of ethanol-exposed rats. Bonferroni's test for multiple comparisons indicated that both bupropion and fluoxetine administrations increased the mRNA levels of *Nape-pld* ($*p<0.05$) and decreased the mRNA levels of *Dagl α* and *Dagl β* ($*p<0.05$) in the mPFC of ethanol-exposed rats compared to those of the vehicle group (Fig. 2(A)). Specifically, fluoxetine also increased the mRNA levels of *Cnr2* and decreased the mRNA levels of *Ppar α* in the mPFC of ethanol-exposed rats compared to vehicle group ($*p<0.05$; Fig. 2(A)). No changes in *Cnr1*, *Ppar γ* , *Faah* and *Mgll* mRNA levels were found in the mPFC of the treated rats.

3.3. Effects of bupropion and fluoxetine on mRNA levels of glutamate system-related elements in mPFC

One-way ANOVA indicated significant changes in the mRNA levels of *Grin1* ($F_{2,19}=6.66$; $p=0.006$), *Grin2b* ($F_{2,19}=5.64$; $p=0.011$) and *Gria2* ($F_{2,19}=4.30$; $p=0.028$) in the mPFC of ethanol-exposed rats. Bonferroni's test for mul-

tiples comparisons indicated that both bupropion and fluoxetine administrations reduced the mRNA levels of *Grin1* ($*/**p<0.05/0.01$) in the mPFC of ethanol-exposed rats compared to those of the vehicle group (Fig. 2(B)). Specifically, fluoxetine also decreased the mRNA levels of *Grin2b* ($**p<0.01$) and increased the mRNA levels of *Gria2* and *Gria3* ($*p<0.05$) in the mPFC of ethanol-exposed rats compared to vehicle-treated rats (Fig. 2(B)). No changes in mRNA levels of *Gls*, *Gls2*, *Grin2a*, *Grin2c*, *Gria1*, *Gria4*, *Grm3*, *Grm5* and *Slc1a1* were found in the mPFC of the treated rats.

3.4. Effects of bupropion and fluoxetine on the expression of selected proteins of the endocannabinoid system and glutamate receptors in mPFC

Following the previous results of mRNA levels, we evaluated the protein expression of selected elements of the endocannabinoid system and glutamate receptors in the mPFC of ethanol-exposed rats. Regarding the endocannabinoid system, one-way ANOVA indicated significant changes in the protein levels of CB₁ ($F_{2,6}=4.58$; $p=0.033$), CB₂ ($F_{2,6}=12.19$; $p=0.0005$), PPAR α ($F_{2,6}=5.47$; $p=0.020$), DAGL α ($F_{2,6}=21.01$; $p=0.001$) and MAGL ($F_{2,6}=10.04$; $p=0.0007$) in the mPFC of ethanol-exposed rats. Bonferroni's test for multiple comparisons indicated that bupropion decreased the protein levels of CB₁, PPAR α , DAGL α and MAGL in the mPFC of ethanol-exposed rats compared to those of the vehicle-treated rats ($*/**/*p<0.05/0.01/0.001$; Fig. 3(A) and (C)). Fluoxetine specifically increased the CB₂ protein levels and decreased the DAGL α protein levels in the mPFC of ethanol-exposed rats compared to the vehicle group. ($*/**p<0.05/0.01$; Fig. 3(A) and (C)). Regarding the glutamatergic receptors, one-way ANOVA indicated significant changes in the protein levels of GluN1 ($F_{2,6}=31.67$; $p=0.0006$), GluA1 ($F_{2,6}=35.47$; $p=0.0005$) and mGlu5 ($F_{2,6}=7.23$; $p=0.025$). Bonferroni's test for multiple comparisons indicated that both bupropion and fluoxetine decreased the protein levels of GluN1 and GluA1 in the mPFC of the ethanol-exposed rats compared with vehicle-treated animals ($**/*p<0.01/0.001$; Fig. 3(B) and (D)). Specifically, the mPFC of the ethanol-exposed rats treated with bupropion also had reduced protein levels of mGlu5 compared to vehicle-treated rats ($*p<0.05$; Fig. 3(B) and (D)).

4. Discussion

The present study indicates that subchronic treatment with bupropion did not induce the sustained increase in alcohol consumption observed after cessation of fluoxetine administration, in accordance with our previous results (Alen et al., 2013, 2014). In addition, the increase in alcohol consumption found in fluoxetine-exposed animals is associated with specific changes in the mRNA and protein expression of endocannabinoid-signaling elements such as the cannabinoid CB₂ receptor, the PPAR α receptor or the endocannabinoid-degrading enzyme MAGL. Overall, the present data supports the notion that antidepressants that

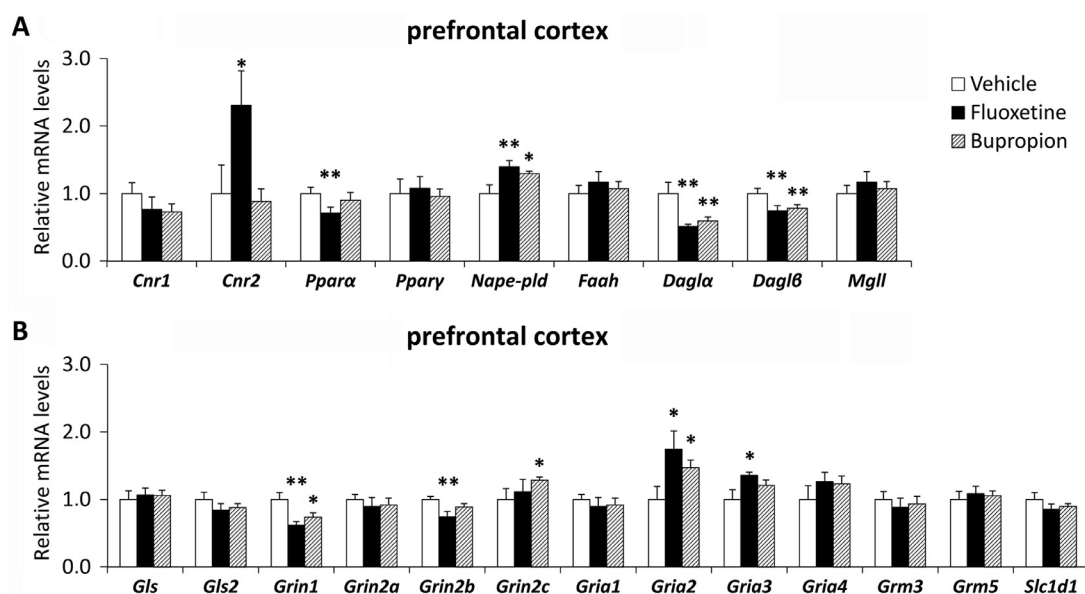


Fig. 2 Relative mRNA levels of endocannabinoid (A) and glutamate (B) signaling system-related genes in the mPFCx of adult rats exposed to ethanol self-administration and treated with vehicle, fluoxetine or bupropion. Bars represent the means \pm SEM (Vehicle, $n = 8$; Fluoxetine, $n = 6$; Bupropion, $n = 8$). Bonferroni analysis: * $p < 0.05$ vs. vehicle group.

do not target serotonin neurotransmission might offer a more secure profile than classical ISSR ones.

The pharmacological profile of bupropion observed in the present study was clearly different from that of other antidepressants such as fluoxetine, venlafaxine and atomoxetine, that induce an increase in alcohol consumption after relapse (Alen et al. 2014a, 2014b). Bupropion not only does not affect alcohol consumption but also has a less disruptive impact on the endocannabinoid/*N*-acylethanolamine and glutamatergic and systems than that observed after fluoxetine. This differential impact might contribute to the lack of alcohol relapse-enhancing effects of this drug. Despite the fact that the functionality of the serotonergic, noradrenergic or dopaminergic systems was not directly assessed, based on the pharmacological properties of the drugs used in this study we can state that the serotonergic profile of fluoxetine is related to the observed increases in alcohol consumption in relapse, while the noradrenergic/dopaminergic profile of bupropion not associated with this unwanted side effect. Further research using selective noradrenergic uptake blockers such as reboxetine might be needed to clarify whether they offer a profile devoid of side effects such as that observed with mixed dopamine/noradrenaline antidepressants.

In any case, the present results would be in agreement with early studies using the intracranial self-stimulation (ICSS) paradigm that show that noradrenaline and serotonin antidepressants have a negative impact in the reward system, assessed in the intracranial self-stimulation paradigm, while bupropion had no effect (McCarter and Kokkinidis 1988). Despite the fact that we did not assess the integrity of the dopaminergic/opioidergic reward system, it may play an important role in the observed results, possibly explaining the long-lasting nature of the increases in alcohol consumption, somehow resembling the phenomenon of cross tolerance between drugs of abuse and

this could be mediated by the cannabinoid and glutamatergic systems (Fattore et al., 2004; Gardner, 2005; Konradi et al., 2017). Concerning the specific findings of fluoxetine on the endocannabinoid and glutamatergic systems after alcohol relapse, it is important to note that despite the long history and widespread use of antidepressants, there is scarce information regarding the way in which antidepressants modulates those signaling systems in the brain systems (Cruceanu et al., 2017; Rodríguez-Muñoz et al., 2017). In our experimental approach, the most prominent signal identified is the enhanced expression of cannabinoid CB2 receptors in fluoxetine-treated animals. Cannabinoid CB2 receptors have been identified as receptors expressed by glial cells and neurons (Onaivi et al., 2012). That control alcohol self-administration in rodents (Navarrete et al., 2018; Ortega-Álvarez et al., 2015). Whether this differential expression contribute to the enhanced alcohol consumption observed after cessation of fluoxetine treatment or it is just a marker of alcohol-induced alterations in the PFC cannot be clearly established with the present exploratory design. In this respect, animals previously treated with fluoxetine drank almost double than control animals, so alcohol might induce greater neuroinflammation associated to enhanced glial reactivity affecting cannabinoid CB2 receptor expression, than that observed in bupropion or control relapsing animals. Additionally, It is possible that withdrawal from fluoxetine treatment might induce a negative affective state that promotes drinking or adaptive changes in glutamate transmission that again might enhance drinking. The later hypothesis is currently being explored in our laboratory. We have identified that in central amygdala circuits there are plastic changes in glutamate transmission induced by fluoxetine cessation in a context of alcohol self-administration. Increases in the gene expression of CB₂ receptor in the whole brain seems to be induced also by other drugs of abuse, since they have been observed after chronic treatment with

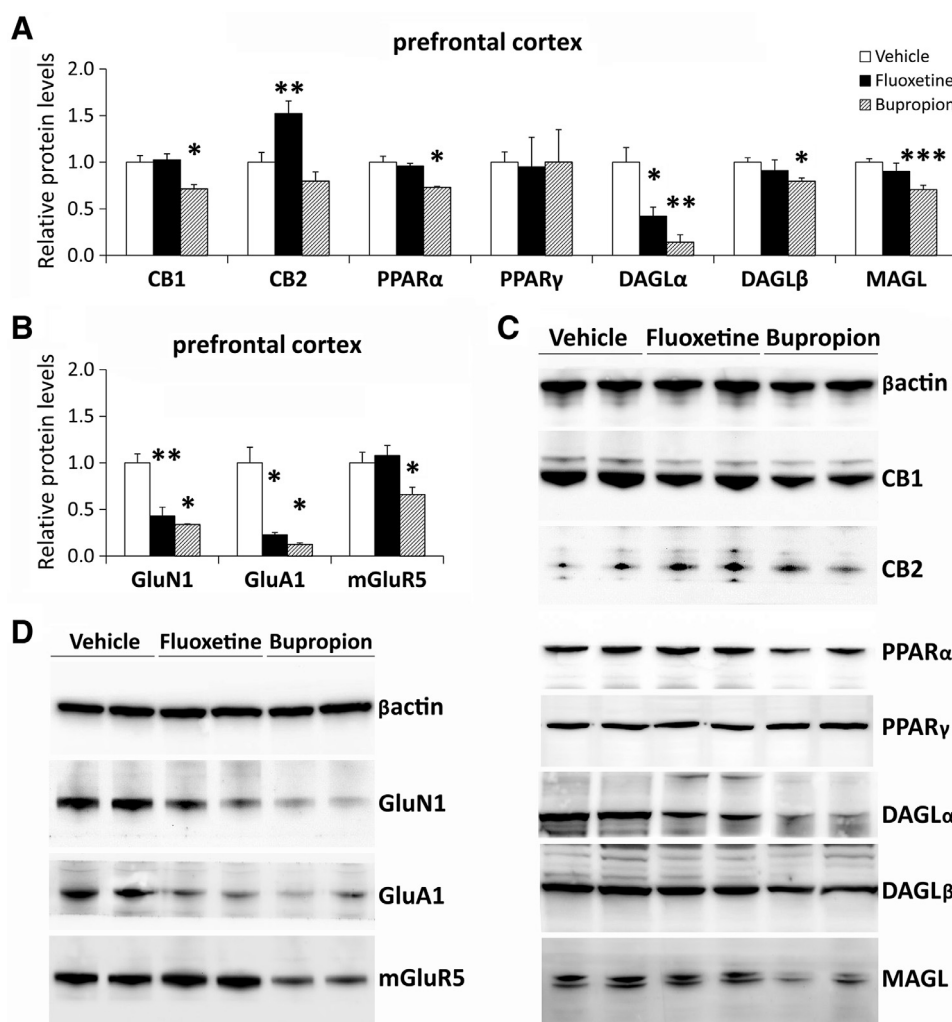


Fig. 3 Relative protein levels of selected components of the endocannabinoid (A) and glutamate (B) signaling system in the mPFC of adult rats exposed to ethanol self-administration and treated with vehicle, fluoxetine or bupropion. Representative immunoblots of respective proteins were also shown (C) and (D). Bars represent the means \pm SEM ($n = 3$ /group). Bonferroni analysis: */**/** $p < 0.05/0.01/0.001$ vs. vehicle group.

heroin or cocaine in the C57Bl/6 mouse, which displays a natural preference for alcohol (Onaivi et al. 2008). Brain CB₂ receptors appear to be associated with neuropsychiatric disorders such as AUD or depression and are supposed to explain some common phenotypes in these disorders (Onaivi et al., 2012; Roche and Finn 2010). In agreement with that, recent studies have found that animals lacking CB₂ receptors exhibit alcohol preference derived of dysregulated endogenous opioid transmission (Ortega-Álvarez et al., 2015). It is known that the expression of CB₂ in the brain is increased under inflammatory conditions, which are also present in neuropsychiatric disorders, including AUDs and depression, and they are supposed to constitute a protective response to excitotoxicity induced by excessive glutamatergic activity (Roche and Finn 2010).

Additionally, markers of reduced N-acyl ethanolamine activity such as PPARα, DAGLα, DAGLβ or MAGL expression have been reported in models of inflammation or alcohol exposure (Birch et al. 2016). Other alterations in the en-

docannabinoid system that were found in both the fluoxetine and the bupropion-treated groups are also compatible with a neuroprotective response of the brain by the endocannabinoid and N-acyl ethanolamine systems (see Pistis and Muntoni 2017; Sanchez-Marín et al. 2017). However, the observed alterations in gene expression of *Cnr2* and *Pparα*, which were observed only in the fluoxetine-treated group, suggest a greater extent of cannabinoid disruption in this group, and this could be related to the increased alcohol consumption during relapse observed in this group (see Anderson 2018; Atigari et al., 2013; Brookwell et al., 2014; Charney et al., 2015; Menkes and Herxheimer 2014).

The endocannabinoid system plays an important regulatory role of glutamatergic neurotransmission acting as retrograde signals (see Eisenhardt et al., 2015; Hermann et al. 2012; Rodríguez-Muñoz et al., 2016). Specifically, glutamatergic hyperfunction and related excitotoxicity may be landmarks of depressive states and vulnerability to alcohol consumption (Lakhan et al., 2013; Vengeliene et al., 2008).

Thus, the greater alterations in the endocannabinoid system observed in the fluoxetine group may be compatible with a poorer negative control over glutamatergic activity which would result in increased excitotoxicity and alterations in neuroplasticity conducive to alcohol relapse (Vengeliene et al., 2008).

The present results are in agreement with previous studies that suggest a tendency towards increases in the AMPA balance with respect to NMDA or mGlu receptors in the glutamatergic system, both in depression and in the progression to AUDs (Hwa et al., 2017; Rubio-Casillas and Fernández-Guasti 2016). Thus, we observed a reduction in gene and protein expression related to various NMDA receptors such as *Grin1*, *Grin2b*, *GluN1* in the fluoxetine group, as well as a marked increase in markers of AMPA function such as the mRNA levels of *Gria2* and *Gria3*. By contrast, we found that the protein expression of *GluA1* was reduced in the fluoxetine group, and a similar trend was also observed in bupropion-treated rats. In agreement with previous reports (Cruceanu et al., 2017) we did not observe any significant alteration in the gene expression of the mGlu receptors (*Grm3* and *Grm5*). All these data are coherent with the presence of alterations in neuroplasticity in those animals that showed an enhanced relapse to alcohol drinking after the fluoxetine treatment, similar to those present in inflammatory processes and that have also been reported for mood disorders and in the establishment of addiction (Leclercq et al., 2017). Alterations in brain functions similar to those observed in our study could be involved in the numerous clinical cases and reports that describe negative effects of antidepressants on alcohol consumption and/or depression (see Atigari et al., 2013; Brookwell et al., 2014; Charney et al., 2015; Menkes and Herxheimer 2014).

Numerous authors have called attention to the lack of basic and clinical studies in comorbid populations with AUD and mood disorders, which could inform the currently sketchy practice, where the prescription rate of antidepressants is high and they are considered over-prescribed (Anderson 2018; Foulds et al., 2015; Mark et al., 2003; Petrakis et al., 2012). Moreover, it is often suggested that maximally tolerated doses of the antidepressants should be used in these patients, what would reasonably be expected to magnify the negative effects on relapse to alcohol (Ciraulo et al., 1988; Pettinati et al., 2015). and eventually could worsen drinking outcomes in these patients. The bupropion dose used here, as in the case of fluoxetine, has been shown to have antidepressant properties in rats and could, therefore be comparable to human doses used for these same effects (Machado et al. 2012; Weiss et al., 2012).

The possibility that a higher dose of bupropion could share the negative effects on alcohol consumption should be investigated in the future. Also, the peculiar animal model used here limits the generalizability of the results and different models should be explored in the future, in animals and humans, to ascertain the validity of our results. Another limitation of this study is that differences in alcohol consumption found between the experimental groups cannot be ruled out to play some role in the observed brain alterations, although alcohol was present in both groups. Further research is needed to clarify the contribution of monoaminergic transmission to the unwanted effects of fluoxetine,

exploring ventral striatum and amygdalar circuits that might contribute to the enhanced alcohol consumption derived of ISSR treatment cessation.

Incidentally, bupropion is deemed effective in the treatment of nicotine addiction with or without comorbid depression, though its effectiveness for smoking dependence may be related to its actions on nicotine receptors (Torrens et al., 2005). Some issues should, however, be considered with respect to the use of bupropion for the treatment of depression in the case of AUD: for example, its abuse potential or the possibility that bupropion could lower seizure thresholds when combined with alcohol (Silverstone et al., 2008; Wu and Juurlink 2016). Despite the possible danger that some antidepressants may pose over the success of the alcohol abstinence, it is generally considered that concurrent substance abuse should not be a barrier to treating depression (Nunes and Levin 2004). People with comorbid mood disorder and alcohol or other substance use disorder are hard to treat and for this reason, more research is needed until we can reach safe interventions for depression and/or alcohol consumption in these patients in order to achieve the best results. We are aware that the use of a single dose of each drug represents a limitation and the possible existence of a dose-dependent effect of both fluoxetine and bupropion on alcohol consumption in relapse will need to be addressed in future studies.

Statements of interest

There are no actual or potential conflicts of interest.

Funding

Fulbright Visiting Scholar Program, United States Department of State, [Ministerio de Educación, Cultura y Deporte](#) (JS: CAS16/00038); RETICS Red de Trastornos Adictivos, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) and European Regional Development Funds-European Union (ERDF-EU) (FRF: RD16/0017/0001); Plan Nacional sobre Drogas, Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (JS: PNSD2015/047; LO PNSD2015/005; AS: PND2017/043); Instituto de Salud Carlos III, MINECO co-funded by ERDF-EU (FRF: PI16/01698; AS: PI17/02026); Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo, Junta de Andalucía, ERDF-EU (FRF: CTS-8221); Consejería de Salud, Junta de Andalucía, ERDF-EU (FRF: SAS111224). JS holds a “Miguel Servet II” research contract from the National System of Health, ISCIII, ERDF-EU (CP117/00024); AS and FJP hold a “Miguel Servet I” research contract funded by ISCIII and ERDF-EU (CP14/00173 and CP14/00212, respectively).

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:[10.1016/j.euroneuro.2019.03.012](https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2019.03.012).

References

- Alén, F., Orio, L., Gorriti, M.Á., de Heras, R.G., Ramírez-López, M.T., Pozo, M.Á., de Fonseca, F.R., 2013. Increased alcohol consumption in rats after subchronic antidepressant treatment. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 16, 1809-1818.
- Alén, F., et al., 2009. Cannabinoid-induced increase in relapse-like drinking is prevented by the blockade of the glycine-binding site of N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroscience* 158, 465-473.
- Alén, F., et al., 2014. The administration of atomoxetine during alcohol deprivation induces a time-limited increase in alcohol consumption after relapse. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 17, 1905-1910.
- Anderson, K., 2018. (HOME) could SSRIs lead to increased alcohol consumption in some populations?
- Atigari, O.V., Kelly, A-M, Jabeen, Q., Healy, D., 2013. New onset alcohol dependence linked to treatment with selective serotonin reuptake inhibitors. *Int. J. Risk Saf. Med.* 25, 105-109.
- Barrot, M., et al., 2005. Regulation of anxiety and initiation of sexual behavior by CREB in the nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 8357-8362.
- Birch, A., et al., 2016. Alterations in the expression of transcription factors PPAR γ and NF κ B in the brain of models of chronic pain.
- Brookwell, L., Hogan, C., Healy, D., Mangin, D., 2014. Ninety-three cases of alcohol dependence following SSRI treatment. *Int. J. Risk Saf. Med.* 26, 99-107.
- Charney, D.A., Heath, L.M., Zikos, E., Palacios-Boix, J., Gill, K.J., 2015. Poorer drinking outcomes with citalopram treatment for alcohol dependence: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Alcohol.: Clin. Exp. Res.* 39, 1756-1765.
- Cippitelli, A., Bilbao, A., Hansson, A.C., del Arco, I., Sommer, W., Heilig, M., Massi, M., Bermúdez-Silva, F.J., Navarro, M., Cicciocioppo, R., de Fonseca, F.R. European TARGALC Consortium, 2005. Cannabinoid CB1 receptor antagonism reduces conditioned reinstatement of ethanol-seeking behavior in rats. *Eur. J. Neurosci.* 21, 2243-2251.
- Ciraulo, D.A., Barnhill, J.G., Jaffe, J.H., 1988. Clinical pharmacokinetics of imipramine and desipramine in alcoholics and normal volunteers. *Clin. Pharmacol. Ther.* 43, 509-518.
- Cruceanu, C., Lopez, J., Tsai, W., Turecki, G., 2017. Dysregulation of the glutamatergic receptors after antidepressant treatment in human neural progenitor cells. *Mol. Psychiatry* 22, 1228.
- Davidson, K.M., 2018. Diagnosis of depression in alcohol dependence: changes in prevalence with drinking status. *Br. J. Psychiatry* 166, 199-204. doi:10.1192/bjp.166.2.199.
- Deussing, J.M., 2006. Animal models of depression. *Drug Discov. Today: Disease Models* 3, 375-383.
- Drogas, OEs, 2016. Encuesta Domiciliaria Sobre Alcohol y Drogas En España (EDADES), 2015-2016. Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas, Ministerio del Interior, Madrid.
- Eisenhardt, M., Leixner, S., Luján, R., Spanagel, R., Bilbao, A., 2015. Glutamate receptors within the mesolimbic dopamine system mediate alcohol relapse behavior. *J. Neurosci.* 35, 15523-15538.
- Farley, S., Dumas, S., El Mestikawy, S., Giros, B., 2012. Increased expression of the Vesicular Glutamate Transporter-1 (VGLUT1) in the prefrontal cortex correlates with differential vulnerability to chronic stress in various mouse strains: effects of fluoxetine and MK-801. *Neuropharmacology* 62, 503-517. doi:10.1016/j.neuropharm.2011.09.010.
- Fattore, L., Cossu, G., Spano, M.S., Deiana, S., Fadda, P., Scherma, M., W, Fratta, 2004. Cannabinoids and reward: interactions with the opioid system. *Crit. Rev. Neurobiol.* 16, 147-158.
- Fergusson, D.M., Boden, J.M., Horwood, L.J., 2009. Tests of causal links between alcohol abuse or dependence and major depression. *Arch. Gen. Psychiatry* 66, 260-266.
- Foulds, J.A., Adamson, S.J., Boden, J.M., Williman, J.A., Mulder, R.T., 2015. Depression in patients with alcohol use disorders: systematic review and meta-analysis of outcomes for independent and substance-induced disorders. *J. Affect. Disord.* 185, 47-59.
- Gardner, EL, 2005. Endocannabinoid signaling system and brain reward: emphasis on dopamine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 81, 263-284.
- Hall, B.J., Slade, S., Wells, C., Rose, J.E., Levin, E.D., 2015. Bupropion-varenicline interactions and nicotine self-administration behavior in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 130, 84-89.
- Hansson, A.C., et al., 2007. Genetic impairment of frontocortical endocannabinoid degradation and high alcohol preference. *Neuropsychopharmacology* 32, 117.
- Hauser, S.R., Getachew, B., Taylor, R.E., Tizabi, Y., 2011. Alcohol induced depressive-like behavior is associated with a reduction in hippocampal BDNF. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 100, 253-258.
- Haw, C., Stubbs, J., 2011. Patient information leaflets for antidepressants: are patients getting the information they need? *J. Affect. Disord.* 128, 165-170.
- Hermann, D., et al., 2012. Translational magnetic resonance spectroscopy reveals excessive central glutamate levels during alcohol withdrawal in humans and rats. *Biol. Psychiatry* 71, 1015-1021.
- Hwa, L., Besheer, J., Kash, T., 2017. Glutamate plasticity woven through the progression to alcohol use disorder: a multi-circuit perspective. *F1000 Res.* 6.
- Karlsson, R-M, et al., 2012. Reduced alcohol intake and reward associated with impaired endocannabinoid signaling in mice with a deletion of the glutamate transporter GLAST. *Neuropharmacology* 63, 181-189.
- Khantzian, E.J., 1997. The self-medication hypothesis of substance use disorders: a reconsideration and recent applications. *Harv. Rev. Psychiatry* 4, 231-244.
- Konradi, C., Hope, B., Cole, D., Schwarzkild, M., Cole, R.L., Hyman, S.E., 2017. Molecular mechanisms of striatal gene regulation: a critical role for glutamate in dopamine-mediated induction. *Pharmacological Regulation of Gene Expression in the CNS Towards an Understanding of Basal Ganglia Functions* (1996). CRC Press, pp. 129-148.
- Kranzler, H.R., Burleson, J.A., Korner, P., Del Boca, F.K., 1995. Placebo-controlled trial of fluoxetine as an adjunct to relapse prevention in alcoholics. *Am. J. Psychiatry* 152, 391.
- Lakhan, S.E., Caro, M., Hadzimechalis, N., 2013. NMDA receptor activity in neuropsychiatric disorders. *Front. Psychiatry* 4, 52. doi:10.3389/fpsy.2013.00052.
- Leclercq, S., de Timary, P., Delzenne, N.M., Stärkel, P., 2017. The link between inflammation, bugs, the intestine and the brain in alcohol dependence. *Transl. Psychiatry* 7, e1048. doi:10.1038/tp.2017.15.
- Machado, D.G., et al., 2012. Fluoxetine reverses depressive-like behaviors and increases hippocampal acetylcholinesterase activity induced by olfactory bulbectomy. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 103, 220-229.
- Mark, T.L., Kranzler, H.R., Song, X., Bransberger, P., Poole, V.H., Crosse, S., 2003. Physicians' opinions about medications to treat alcoholism. *Addiction* 98, 617-626.
- McCarter, B.D., Kokkinidis, L., 1988. The effects of long-term administration of antidepressant drugs on intracranial self-stimulation responding in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 31, 243-247.
- Menkes, D.B., Herxheimer, A., 2014. Interaction between antidepressants and alcohol: signal amplification by multiple case reports. *Int. J. Risk Saf. Med.* 26, 163-170.
- Naranjo, C., Bremner, K., 1993. Clinical pharmacology of serotonin-altering medications for decreasing alcohol consumption. *Alcohol Alcohol.* (Oxford, Oxfordshire) Suppl. 2, 221-229.

- Naranjo, C.A., Knoke, D.M., 2001. The role of selective serotonin reuptake inhibitors in reducing alcohol consumption. *J. Clin. Psychiatry*.
- Navarrete, F., García-Gutiérrez, M.S., Manzanares, J., 2018. Pharmacological regulation of cannabinoid CB2 receptor modulates the reinforcing and motivational actions of ethanol. *Biochem. Pharmacol.* 157, 227-234.
- Nunes, E.V., Levin, F.R., 2004. Treatment of depression in patients with alcohol or other drug dependence: a meta-analysis. *JAMA* 291, 1887-1896.
- Onaivi, E.S., et al., 2008. Brain neuronal cb2 cannabinoid receptors in drug abuse and depression: from mice to human subjects. *PLOS ONE* 3, e1640. doi:10.1371/journal.pone.0001640.
- Onaivi, E.S., Ishiguro, H., Gu, S., Liu, Q-R, 2012. CNS effects of CB2 cannabinoid receptors: beyond neuro-immuno-cannabinoid activity. *J. Psychopharmacol.* 26, 92-103.
- Ortega-Álvarez, A., Ternianov, A., Aracil-Fernández, A., Navarrete, F., García-Gutiérrez, M.S., Manzanares, J., 2015. Role of cannabinoid CB2 receptor in the reinforcing actions of ethanol. *Addict. Biol.* 20, 43-55.
- Paré, A.M., Paré, W.P., Kluczynski, J., 1999. Negative affect and voluntary alcohol consumption in Wistar-Kyoto (WKY) and Sprague-Dawley rats. *Physiol. Behav.* 67, 219-225.
- Paxinos, G., Franklin, K.B.J., 2004. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Compact 2nd ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam; Boston.
- Petrakis, I.L., Ralevski, E., Desai, N., Trevisan, L., Gueorguieva, R., Rounsaville, B., Krystal, J.H., 2012. Noradrenergic vs serotonergic antidepressant with or without naltrexone for veterans with PTSD and comorbid alcohol dependence. *Neuropsychopharmacology* 37, 996.
- Pettinati, H.M., O'Brien, C.P., Dundon, W.D., 2015. Current status of co-occurring mood and substance use disorders: a new therapeutic target. *Focus* 13, 356-362.
- Pietraszek, M., Urano, T., Sumiowski, K., Serizawa, K., Takahashi, S., Takada, Y., Takada, A., 1991. Alcohol-induced depression: involvement of serotonin. *Alcohol Alcohol.* 26, 155-159.
- Pistis, M., Muntoni, A.L., 2017. Roles of N-acyl ethanolamines in brain functions and neuropsychiatric diseases. *Endocannabinoids and Lipid Mediators in Brain Functions*. Springer, pp. 319-346.
- Roche, M., Finn, D.P., 2010. Brain CB2 receptors: implications for neuropsychiatric disorders. *Pharmaceuticals* 3, 2517-2553.
- Rodríguez-Muñoz, M., Sánchez-Blázquez, P., Callado, L.F., Meana, J.J., Garzón-Niño, J., 2017. Schizophrenia and depression, two poles of endocannabinoid system deregulation. *Transl. Psychiatry* 7, 1291.
- Rodríguez-Muñoz, M., Sánchez-Blázquez, P., Merlos, M., Garzón-Niño, J., 2016. Endocannabinoid control of glutamate NMDA receptors: the therapeutic potential and consequences of dysfunction. *Oncotarget* 7, 55840.
- Rogowski, A., Kostowski, W., Bienkowski, P., 2002. Sucrose self-administration predicts only initial phase of ethanol-reinforced behaviour in Wistar rats. *Alcohol Alcohol.* 37, 436-440.
- Rubio-Casillas, A., Fernández-Guasti, A., 2016. The dose makes the poison: from glutamate-mediated neurogenesis to neuronal atrophy and depression. *Rev. Neurosci.* 27, 599-622.
- Russell, V.A., Sagvolden, T., Johansen, E.B., 2005. Animal models of attention-deficit hyperactivity disorder. *Behav Brain Funct.* 1, 9. doi:10.1186/1744-9081-1-9, 1744-9081-1-9 [pii].
- Samson, H.H., Czachowski, C.L., 2003. Behavioral measures of alcohol self-administration and intake control: rodent models.
- Samson, H.H., Sharpe, A.L., Denning, C., 1999. Initiation of ethanol self-administration in the rat using sucrose substitution in a sipper-tube procedure. *Psychopharmacology* 147, 274-279.
- Sanchez-Marin, L., et al., 2017. Effects of intermittent alcohol exposure on emotion and cognition: a potential role for the endogenous cannabinoid system and neuroinflammation. *Front. Behav. Neurosci.* 11, 15.
- Schuckit, M.A., Tipp, J.E., Bergman, M., Reich, W., 1997. Comparison of induced and independent major depressive disorders in 2945 alcoholics. *Am. J. Psychiatry* 154, 948.
- Serrano, A., et al., 2012. Adiponectin promoter activator NP-1 reduces body weight and hepatic steatosis in high-fat diet-fed animals. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 302, E817-E830.
- Silverstone, P.H., Williams, R., McMahon, L., Fleming, R., Fogarty, S., 2008. Alcohol significantly lowers the seizure threshold in mice when co-administered with bupropion hydrochloride. *Ann. Gen. Psychiatry* 7, 11.
- Soeters, H.S., Howells, F.M., Russell, V.A., 2008. Methylphenidate does not increase ethanol consumption in a rat model for attention-deficit hyperactivity disorder-the spontaneously hypertensive rat. *Metab. Brain Dis.* 23:303-314 doi:10.1007/s11011-008-9098-1.
- Suarez, J., Bermudez-Silva, F.J., Mackie, K., Ledent, C., Zimmer, A., Cravatt, B.F., de Fonseca, F.R., 2008. Immunohistochemical description of the endogenous cannabinoid system in the rat cerebellum and functionally related nuclei. *J. Comput. Neurol.* 509, 400-421. doi:10.1002/cne.21774.
- Torrens, M., Fonseca, F., Mateu, G., Farré, M., 2005. Efficacy of antidepressants in substance use disorders with and without comorbid depression. *Drug Alcohol Depend.* 78, 1-22.
- Trullas, R., Skolnick, P., 1990. Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. *Eur. J. Pharmacol.* 185, 1-10.
- Vengeliene, V., Bilbao, A., Molander, A., Spanagel, R., 2008. Neuropharmacology of alcohol addiction. *Br. J. Pharmacol.* 154, 299-315.
- Vengeliene, V., Bilbao, A., Spanagel, R., 2014. The alcohol deprivation effect model for studying relapse behavior: a comparison between rats and mice. *Alcohol* 48, 313-320.
- Weiss, J., Demetrikopoulos, M.K., McCurdy, P.M., West, C.H.K., Bonsall, R.W., 2012. Depression seen through an animal model: an expanded hypothesis of pathophysiology and improved models. doi:10.1093/acprof:oso/9780195133585.003.0001.
- Wilkes, S., 2008. The use of bupropion SR in cigarette smoking cessation. *Int. J. Chronic Obstr. Pulm. Dis.* 3, 45-53.
- Willner, P., 1991. *Behavioural Models in Psychopharmacology: Theoretical, Industrial and Clinical Perspectives*, pp. 89-175.
- Winstock, A.R., 2017. *The global drug survey 2017. Findings Global Drug Survey*.
- Wu, P., Juurlink, D., 2016. Bupropion Critical Care Toxicology: 1-10.
- Zarate, J., Churrua, I., Echevarría, E., Casis, L., López de Jesús, M., Saenz del Burgo, L., Sallés, J., 2008. Immunohistochemical localization of CB1 cannabinoid receptors in frontal cortex and related limbic areas in obese Zucker rats: effects of chronic fluoxetine treatment. *Brain Res.* 1236, 57-72. doi:10.1016/j.brainres.2008.07.100.

ANEXO 2

Ballesta A, Alén F, Orio L, Arco R, Vadas E, Decara J, Vargas A, Gómez de Heras R, Ramírez-López M, Serrano A, Javier Pavón F, Suárez J, Rodríguez de Fonseca F (2019) **Blocking Noradrenaline Uptake with Reboxetine Along Alcohol Deprivation Results in Alcohol Intake Escalation After Reinstatement of Drinking.** *Addiction biology. In press*

Blocking Noradrenaline Uptake with Reboxetine Along Alcohol Deprivation Results in Alcohol Intake Escalation After Reinstatement of Drinking

Journal:	<i>Addiction Biology</i>
Manuscript ID	Draft
Wiley - Manuscript type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	<p>Ballesta, Antonio Javier Alen, Francisco; INSTITUTO IBIMA, UGC SALUD MENTAL Orio, Laura; Complutense University of Madrid, Psychobiology Arco, Rocio; Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Hospital Regional Universitario de Málaga, Spain Vadas, Evelyn; Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Hospital Regional Universitario de Málaga, Spain Decara, Juan; Instituto IBIMA, UGC Salud Mental Vargas, Antonio; IBIMA-Hospital Regional Universitario de Malaga, Laboratorio de Medicina Regenerativa Gómez de Heras, Raquel; Universidad Complutense, Psicobiología RAMIREZ-LOPEZ, MARIA TERESA; Complutense University of Madrid, Psychobiology Serrano, Antonia; Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Hospital Regional Universitario de Málaga, Spain, Pavon, Francisco Javier; Instituto IBIMA, UGC Salud Mental Suárez, Juan; Fundacion IMABIS, Laboratorio de Medicina Regenerativa RODRIGUEZ DE FONSECA, FERNANDO; Instituto IBIMA, UGC Salud Mental</p>
Keywords:	ACOHOL RELAPSE, NORADRENALINE UPTAKE INHIBITION, ENDOCANNABINOID SYSTEM
Abstract:	<p>Major depression (MD) is a frequent co-morbidity in Alcohol Use Disorders (AU) patients. Antidepressant prescription is often limited by poor clinical outcomes or unwanted side effects in co-morbid AUD-MD patients. Recent studies suggest that abrupt cessation of selective serotonin reuptake inhibitors antidepressant treatment increases alcohol consumption after an alcohol deprivation period in rats. However, the appearance of this effect after the treatment with selective noradrenaline reuptake inhibitors (SNRIs) is not known. Here we report that interruption of subchronic (14 days) treatment with the SNRIs Reboxetine (15 mg/kg/day i.p) resulted in escalation of ethanol intake when the animals resume alcohol self-administration. This effect of Reboxetine treatment cessation was associated with a profound deactivation of the endocannabinoid/acylethanolamide signaling system in the prefrontal cortex but not in the dorsal hippocampus, as reflected by the decrease in the protein expression of the cannabinoid CB1 receptor, the PPARα receptor, the 2-arachidonoylglycerol synthesizing</p>

	<p>enzymes DAGLα and DGALα and the endocannabinoid degrading enzyme MAGL. This was associated with dysregulation of the expression of glutamic acid receptors GLUN1, GLUA1 and mGLUR5 in the medial prefrontal cortex and the dorsal hippocampus of the animals exposed to Reboxetine. The present results further support the idea that abrupt antidepressant therapy along alcohol deprivation time can boost alcohol intake after relapse through mechanisms associated with endocannabinoid/glutamate signaling dysregulation. This finding might be relevant for patients suffering AUD/MD co-morbidity where antidepressant therapy must be monitored with caution for avoiding unwanted side effects if adherence to the treatment is not fully achieved.</p>

Blocking Noradrenaline Uptake with Reboxetine Along Alcohol Deprivation Results in Alcohol Intake Escalation After Reinstatement of Drinking

Antonio Ballesta¹, Francisco Alen^{1,2*}, Laura Orio¹, Rocío Arco², Evelyn Vadas², Juan Decara², Antonio Vargas², Raquel Gómez de Heras¹, Mayte Ramírez-López¹, Antonia Serrano², Francisco Javier Pavón², Juan Suárez^{2*}, Fernando Rodríguez de Fonseca^{1,2*}

Running Title: Noradrenaline uptake blockers in alcoholism

¹Departamento de Psicobiología y Metodología en Ciencias del Comportamiento, Facultad de Psicología, Universidad Complutense de Madrid. 28224 Spain

²Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), UGC Salud Mental, Hospital Regional Universitario de Málaga, Málaga, Spain

*To whom correspondence should be addressed:

Dr. Fernando Rodríguez de Fonseca (fernando.rodriguez@ibima.eu), Dr. Francisco Alén (p_alen@yahoo.es), and Dr. Juan Suárez (juan.suarez@ibima.eu). Laboratorio de Medicina Regenerativa, IBIMA. Hospital Regional Universitario de Málaga. Av. Carlos Haya 82, sótano. Málaga 29010, Spain. Phone: +34669426548. Fax: +34952614012

ABSTRACT

Major depression (MD) is a frequent co-morbidity in Alcohol Use Disorders (AU) patients. Antidepressant prescription is often limited by poor clinical outcomes or unwanted side effects in co-morbid AUD-MD patients. Recent studies suggest that abrupt cessation of selective serotonin reuptake inhibitors antidepressant treatment increases alcohol consumption after an alcohol deprivation period in rats. However, the appearance of this effect after the treatment with selective noradrenaline reuptake inhibitors (SNRIs) is not known. Here we report that interruption of subchronic (14 days) treatment with the SNRI reboxetine (15 mg/kg/day i.p) resulted in escalation of ethanol intake when the animals resume alcohol self-administration. This effect of Reboxetine treatment cessation was associated with a profound deactivation of the endocannabinoid/acylethanolamide signaling system in the prefrontal cortex but not in the dorsal hippocampus, as reflected by the decrease in the protein expression of the cannabinoid CB1 receptor, the PPAR α receptor, the 2-arachidonoylglycerol synthesizing enzymes DAGL α and DGAL β and the endocannabinoid degrading enzyme MAGL. This was associated with dysregulation of the expression of glutamic acid receptors GluN1, GluA1 and mGlu5 in the medial prefrontal cortex and the dorsal hippocampus of the animals exposed to Reboxetine. The present results further support the idea that abrupt cessation of antidepressant therapy along alcohol deprivation time can boost alcohol intake after relapse through mechanisms associated with endocannabinoid/glutamate signaling dysregulation. This finding might be relevant for patients suffering AUD/MD co-morbidity where antidepressant therapy must be monitored with caution for avoiding unwanted side effects if adherence to the treatment is not fully achieved.

Keywords: alcohol, noradrenaline, prefrontal cortex, antidepressant, reboxetine, cannabinoid, glutamate, relapse

For Review Only

INTRODUCTION

The harmful use of alcohol is one of the leading risk factors for population health worldwide, causing 132.6 million disability-adjusted life years (DALYs) - i.e. 5.1% of all DALYs as reported by World Health Organization (Global Status Report on Alcohol and Health, 2018). The development of effective pharmacotherapies for alcohol use disorders (AUD) and associated comorbidities has been very limited, with important problems in drug developments, clinical endpoints and strategies for treatment (Blanco-Gandía and Rodríguez-Arias, 2018; Ch'Ng et al., 2018; Ray et al., 2018). A range of pharmacological interventions including inhibitors of aldehyde dehydrogenase (disulfiram), opioid antagonists (naltrexone), GABA transmission modulators (Topiramate, baclofen) or glutamate NMDA receptors targeting (Acamprosate) have failed to achieve optimal efficacy results both in alcohol drinking and alcohol relapse. The concept of pharmacological aided controlled drinking was recently assayed using nalmefene, in an attempt to achieve alcohol harm reduction. However, there is currently no high-grade evidence for pharmacological treatment to control drinking using nalmefene, naltrexone, acamprosate, baclofen or topiramate in patients with alcohol dependence or alcohol use disorder. Some treatments show low to medium efficacy in reducing drinking across a range of studies with a high risk of bias. None demonstrates any benefit on health outcomes (Palpacuer et al., 2018). In addition, since alcohol induce rapidly liver and brain comorbidities (i.e. liver steatosis and depression/cognitive impairment respectively), the clinical efficacy of existing pharmacotherapies is further affected. This is particularly important in the case of AUD-Major Depression (MD) comorbidity, which is present in more than 1/3 of AUD patients recruited in outpatient settings (García-Marchena et al., 2016); antidepressants have a reduced efficacy in the context of comorbid presence of alcohol use and MD (Torrens et al., 2005).

In addition to the efficacy problems of existing therapies in complicated AUD, concerns are being raised on the safety of current pharmacotherapeutic recommendations for multimorbid AUD: that is, on the unwanted side effects that might occur on AUD comorbid patients with multiple cycles of pharmacotherapy drop outs that occur when alcohol drinking reinstatement occurs. As an example, recent preclinical studies suggest that cessation of antidepressant therapy with selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI) administered along alcohol deprivation periods results in escalation of alcohol consumption after relapse (Alen et al., 2013, 2014). Since negative effects are a key component of relapse, the use of antidepressants and anxiolytics is a crucial component on addiction therapy (Koob and Mason, 2016). However, in order to avoid unwanted side effects associated to a poor adherence to the treatment such as the above described, it is important to understand how the pharmacological profile of the drug being used against comorbid MD interacts with the reinstatement of alcohol consumption.

Major depression has been considered to be associated with impaired functionality of noradrenaline/serotonin transmission (Nutt et al., 2002). Noradrenergic axons, arising from *locus coeruleus* neurons, project to subcortical (i.e. central and basolateral amygdala) and cortical regions (i.e. prefrontal cortex, dorsal hippocampus) where they contribute to the physiological control of emotion and cognition. Noradrenergic neurons control the stress response, arousal, attention, and emotional memories (Borodovitsyna et al., 2017; Delgado and Moreno, 2000; Morilak et al., 2005). In the context of addiction, noradrenaline signaling, along with increased corticotrophin-releasing factor (CRF) transmission within the extended amygdala, are critical for stress-induced relapse of drug-seeking for opiates, cocaine, ethanol, and nicotine. Both, noradrenaline and CRF transmissions in the extended amygdala are also implicated in the increased anxiety that occurs during prolonged abstinence from chronic opiates, cocaine, ethanol,

and cannabinoids. In the prefrontal cortex, noradrenaline input is essential for reward events associated to alcohol (Mantsch et al., 2016), extinction of drug-associated cues and stress-associated relapse (Oliva et al., 2018). The contribution of hippocampal noradrenaline to the extinction of drug-associated memories is also a relevant issue, since prefrontal cortex-amygdala-hippocampus constitute a functional unit that analyzes the hedonic value of the experience on course and relates it to previous hedonic memories (Belujon and Grace, 2011; Furini et al., 2017).

Because of the wide use of SNRI and SSRI antidepressants in the context of AUD-MD comorbidity, and considering the alcohol intake escalation observed after cessation of the SSRI fluoxetine in preclinical models (Alen et al., 2013, 2014), we decided to explore whether a similar pattern of effects on alcohol self-administration reinstatement could be observed after exposure to a SNRI-type antidepressant. To this end, the consequences of cessation from chronic treatment with the SNRI antidepressant Reboxetine were studied in animals with a history of alcohol self-administration that received Reboxetine along alcohol deprivation. In order to gain insight on the mechanistic of Reboxetine action we analyzed both, the mRNA and protein expression of both, the endogenous cannabinoid/acylethanolamide signaling system and the glutamatergic system in the medial prefrontal cortex (mPFC), the dorsal hippocampus (HIP) and the amygdalar complex (AMY). The endogenous cannabinoid/acylethanolamide system is a complex lipid signaling system that regulates both, presynaptic release of glutamate/noradrenaline (Piomelli, 2003; Richter et al., 2012), and postsynaptic plasticity in glutamatergic neurons (Auclair et al., 2000) through receptors present in glutamatergic and noradrenergic terminals (Oropeza et al., 2007; Piomelli, 2003). These cannabinoid/acylethanolamide receptors have been implicated in acute actions of alcohol, alcohol self-administration, genetics preference for alcohol and in conditioned reinstatement of alcohol

self-administration (Bilbao et al., 2016; Cippitelli et al., 2005; Ferrer et al., 2007; Hansson et al., 2007). On the other side, alcohol addiction and relapse to alcohol intake are tightly associated with alcohol-induced changes in glutamate receptors sensitivity that are inhibited by acute alcohol exposure, and sensitized after chronic alcohol consumption. Chronic alcohol abuse produces a hyperglutamatergic state, characterized by elevated extracellular glutamate and altered glutamate receptors and transporters. (Hermann et al., 2012; Vengeliene et al., 2008). Following this rationale, pharmacologically manipulating glutamatergic neurotransmission alters alcohol-related behaviors including intoxication, withdrawal, and alcohol-seeking, in rodents and human subjects (Alen et al., 2009; Holmes et al., 2013). Results obtained indicate that enhancing noradrenergic transmission with the NSRI reboxetine resulted in escalation of alcohol consumption after relapse. The enhanced alcohol intake induced by reboxetine was found to be associated with both endocannabinoid and glutamatergic dysregulated signaling, mainly in mPFC.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Considering that drugs that are used to treat mental disorders are best studied in animal models of the disorder (Russell et al., 2005; Soeters et al., 2008), rats were exposed to a passive model of depression, based on isolation, which is considered to have greater etiological validity than those based on lesions or monoamine depletion (Deussing 2006; Willner 1991). According to this, rats were single-housed from adolescence up to the time of the experiment. Twenty-four adult male Wistar rats (8 per group) (ENVIGO, Barcelona, Spain), kept under a 12-h light/dark cycle (lights off at 12:00 pm) in a room at constant temperature (23 ± 1 °C) and weighted 375-425g at the beginning of the experiments. Standard food and tap water were available *ad-libitum* at the home-cage. All experimental animal procedures were performed in compliance with the European Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes and with Spanish regulations (RD 53/2013 and 178/2004). All protocols were approved by the Ethics Committee of the Universidad Complutense de Madrid. Special care was taken to minimize the suffering and number of animals to achieve our research goals.

Drugs

Reboxetine HCl was purchased from Tocris Bioscience (A Bio-Techne company, Minneapolis, US). Reboxetine solutions were prepared daily by dissolving in 0.9% saline, and were injected intraperitoneally (i.p.) at a dose of 15 mg/kg in a volume of 2 mL/kg as previously described (Alen et al., 2014a). Alcohol solution (10% ethanol w/v solution) was prepared daily from 99% ethanol.

Alcohol self-administration and relapse model

We used an alcohol relapse model based on the alcohol deprivation effect, which is considered to have excellent face and predictive validity in relation to alcohol consumption (Vengeliene et al., 2014). Then, all the animals were trained to lever-press for alcohol self-administration for the same amount of time, and, after they had reached a steady level of self-administration (less than 15% variation in 2 consecutive days, see supplementary table 1), they were sub-chronically treated with vehicle (sterile 0.9% saline) or Reboxetine (15 mg/kg) for 14 days. After that, antidepressant treatment ceased and alcohol self-administration sessions were re-introduced and changes in the patterns of alcohol consumption were monitored for three consecutive weeks.

Specifically, animals were trained to self-administer alcohol in operant chambers (Letica, LE 850 model; Panlab, Barcelona, Spain) enclosed in sound-attenuating boxes and fitted with an exhaust fan. The chambers were equipped with two retractable levers (one being the active lever, and the other being the inactive lever), located on either side of a drinking dipper. The side of the active lever was counterbalanced between sessions to avoid development of location preferences. Pressing the active lever resulted in the delivery of 0.1 mL of the solution, which was present to the animal followed by a 2.5 sec. time-out, while pressing of the inactive lever had no consequences. All the alcohol operant sessions lasted 30 min per day over 5 days/week (Monday to Friday) schedule for the entire study. The number of responses and dipper presentations in both levers were registered automatically by computer software. Animals were weighed daily before the alcohol self-administration sessions. Training was carried out using a modification of the traditional saccharine fading procedure (Samson et al., 1999) described in Alen et al (2009). Once saccharine is eliminated, ethanol can reinforce lever presses in the same way as other reinforcers and, indeed, sucrose self-administration in the later phases of the procedure has been found to be unrelated to saccharine self-administration (Rogowski et al., 2002; Samson and

Czachowski, 2003). During the first 3 days of training, the animals received 0.2% saccharin solution in the dipper to facilitate the acquisition of lever pressing. Thereafter, the following sequence on a fixed-ratio 1 schedule was used: 0.16% saccharine and 2% alcohol for three sessions, 0.12% saccharine and 4% alcohol for three sessions, 0.08% saccharine and 6% alcohol for four sessions, 0.04% saccharine and 8% alcohol for four sessions, 0.02% saccharine plus 10% alcohol, and finally 10% alcohol alone for the rest of sessions. The experiments began once a relatively constant level of alcohol consumption had been reached, following a period of at least 6 weeks of access to alcohol (10% w/v). Then, the 24 animals were randomly assigned to one of the two experimental groups: 1) vehicle; 2) Reboxetine (15 mg/kg), receiving the corresponding treatment for 14 days. After that, animals were let to rest for a period of 24 h, and then the daily 30 min. ethanol self-administration sessions were reintroduced and monitored. See **Figure 1A** for a schematic representation of the experimental procedure.

Tissue collection

One hour after the last alcohol self-administration session, all animals were euthanized by decapitation and their brains were immediately dissected out, frozen on dry ice, and stored at -80 °C. The brains were dissected in 2-mm thick coronal brain slices on dry ice using razor blades and a rat brain slicer matrix (Zivic Instruments, Pittsburgh, PA, USA). The medial prefrontal cortex (mPFC or prelimbic cortex, from Bregma 4.70 mm to 2.20 mm), the dorsal hippocampus (HIP, from Bregma -2.30 mm to -4.80 mm) and the basolateral-central amygdala (AMY, from Bregma -2.56 mm to -3.60 mm) was precisely removed with fine surgical instruments (Paxinos and Franklin, 2004). The samples were stored at -80 °C until further use for gene and protein analyses.

RNA isolation and RT-qPCR analysis

Real-time PCR was used to quantify the relative mRNA levels of different receptors, transporters, and synthesis/degradation enzymes involved in the glutamatergic [liver-type glutaminase isoforms (LGA or GLS2), kidney-type glutaminase isoforms (KGA or GLS1), metabotropic receptors (mGlu3/5), ionotropic glutamate N-methyl D-aspartate (NMDA) receptor subunits (GluN1/2A/2B/2C), ionotropic glutamate a-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA), receptor subunits (GluA1/2/3/4), and the glutamate transporter (Slc1a1 or EAAC1)] and endocannabinoid [cannabinoid receptor type 1 (CB₁) and cannabinoid receptor type 2 (CB₂), peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR- α) and peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ); N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D (NAPE-PLD), diacyl-glycerol lipase alpha/beta (DAGL α/β), fatty acid amide hydrolase (FAAH), and monoacylglycerol lipase (MAGL)] signaling.

We performed real-time PCR (TaqMan, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) as described previously (Blanco et al., 2016) using specific sets of primer probes from TaqMan® Gene Expression Assays (See supplementary **Table S2**). Total RNA was extracted from mPFC samples using Trizol® method, according the manufacturer's instructions (ThermoFisher Scientific). RNA samples were isolated with RNAeasy minelute cleanup-kit including digestion with DNase I column (Qiagen, Hilden, Germany) and quantified using a spectrophotometer to ensure A260/280 ratios of 1.8-2.0. After the reverse transcript reaction from 1 μ g of mRNA, a quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (qPCR) was performed in a CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and the FAM dye labeled format for the TaqMan® Gene Expression Assays (ThermoFisher Scientific). A melting curve analysis was performed to ensure that only a single product was amplified. After analyzing several control genes, values obtained from the brain samples were normalized in relation to β -

actin gene (*Actb*) levels, which was found not to vary significantly between groups. (See Blanco et al., 2016)

Western blot analysis

Western blotting was used to measure the protein levels of the endocannabinoid-related signaling system and the glutamate receptors GluN1, GluA1 and mGlu5 in the mPFC as previously described (Blanco et al., 2016). The samples were homogenized in 50 mM Hepes buffer (pH 8) and 0.32 M sucrose buffer to obtain the membrane protein extracts. For immunoblotting, the protein samples (40 µg) were separated on 10% (w/v) SDS-PAGE gels, transferred to nitrocellulose membranes (BioRad, Hercules, CA, USA) and controlled by Ponceau Red staining. After blocking with 5% (w/v) bovine serum albumin in PBST (0.1% Tween 20 in PBS) at room temperature for 1 h, the membranes were incubated with the following primary antibodies overnight at 4 °C: anti-CB₁ (#ab23703, Abcam, 1:200), anti-CB₂ (#ab3561, Abcam, 1:200), anti-PPAR α (#RDI-PPARAabrx, Fitzgerald, 1:500), anti-PPAR γ (#sc-7273, Santa Cruz, 1:100), anti-DAGL α (1:100), anti-DAGL β (1:50), anti-MAGL (Cayman, 100035, 1:200), GluN1 (#M-207, Sigma-Aldrich, 1:100), GluA1 (#PA5-77416, ThermoFisher, 1:200), and mGlu5 (#PA1-24637, ThermoFisher, 1:500) (see supplementary **Table S3** for further information). A HRP-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG (H+L) secondary antibodies (Promega, Madison, WI, USA) diluted 1:10,000 was added for 1 hour at room temperature. The specific protein bands were visualized and quantified by chemiluminescence using an imaging AutoChemi™ UVP BioImaging System (LTF Labortechnik, Bodensee, Germany). β -actin was quantified and used as a loading control (anti- β -actin diluted 1:1000 from Sigma-Aldrich, cat. no. A5316).

Data Analysis

Data are means \pm SEM ($n=8$ /group for behavior; $n=6-8$ /group for mRNA analysis; $n=3$ /group for protein analysis). The operant alcohol self-administration results were analyzed by means of a two-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measures (time and treatment as factors), and multiple comparison *post-hoc* test (Bonferroni) when appropriate. Regarding mRNA and protein levels, results were also analyzed using unpaired two-side Student's *t* test. The statistical analysis of all results was performed using the computer program GraphPad Prism v6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A *p*-value less than 0.05 was considered to be statistically significant.

RESULTS

Effects of Reboxetine on weekly alcohol self-administration after relapse

After achieving a relatively constant level of active lever pressing and alcohol self-administration during the last week of acquisition period (baseline), rats were exposed to an alcohol deprivation period of 14 days (**Fig. 1A**). During alcohol deprivation, rats were daily treated with vehicle or reboxetine. The general repeated measures ANOVA indicated a treatment effect on ethanol self-administration in reboxetine-treated rats, that was pressed in the three consecutive weeks of analysis (**Fig. 1B**). Thus, we observed an escalation effect, since the effects on Reboxetine pretreatment on alcohol intake along the first week of relapse although significant ($F_{1, 70}=12.29$, $p<0.0003$), were less intense than those observed on the second week of relapse (treatment effect $F_{1, 70}=21.72$, $p<0.0001$), and those registered along the third week of relapse ($F_{1, 70}=34.12$, $p<0.0001$). When the average daily ethanol intake was compared along the three consecutive weeks (**Fig. 1c**), we observed a neat reboxetine pretreatment \times time interaction ($F_{3, 56}=5.92$, $p=0.014$), indicating that reboxetine promotion of alcohol intake ($F_{1, 56}=49.76$, $p<0.0001$) was enhanced along time. Something that was not observed in vehicle treated animals. No baseline

changes in ethanol intake by self-administration were found in the reboxetine group, and no differences were found in inactive-lever pressing when compared to vehicle group.

Effects of Reboxetine on the mRNA levels of cannabinoid/acylethanolamide system-related components in the mPFC

Reboxetine decreased the mRNA levels of *Ppara* ($t_{14}= 2.48$; $p=0.026$), *Dagla* ($t_{14}= 2.37$; $p=0.032$) and *Daglβ* ($t_{14}= 2.26$; $p=0.040$) in the mPFC of ethanol-exposed rats (**Fig. 2A**). No changes in *CB1*, *CB2*, *Pparγ*, *Nape-pld*, *Faah* and *Mgll* mRNA levels were found in the mPFC of the Reboxetine-treated rats when compared with vehicle.

Effects of Reboxetine on the mRNA levels of glutamatergic system-related elements in the mPFC

Reboxetine decreased the mRNA levels of *Gls1* ($t_{14}= 2.37$; $p=0.032$) and *GluN2a* ($t_{14}= 2.56$; $p=0.022$) in the mPFC of ethanol-exposed rats (**Fig. 2B**). No changes in mRNA levels of *Gls2*, *GluN1*, *GluN2b*, *GluN2c*, *GluA1*, *GluA2*, *GluA3*, *GluA4*, *mGlu3*, *mGlu5* and *Slc1a1* were found in the mPFC of the Reboxetine-treated rats when compared with vehicle.

Effects of Reboxetine on the expression of selected proteins of the cannabinoid/acylethanolamide system and glutamatergic receptors in the mPFC

Following the previous results of mRNA levels, we evaluated the protein expression of selected elements of the cannabinoid/acylethanolamide system and glutamatergic receptors in the mPFC of either Reboxetine and vehicle-exposed rats at the end of the third week of relapse. Regarding the cannabinoid/acylethanolamide system, Reboxetine decreased the protein levels of CB₁ ($t_4= 2.98$; $p=0.008$), PPARα ($t_4= 3.15$; $p=0.006$), DAGLα ($t_4= 2.86$; $p=0.018$), DAGLβ ($t_4= 5.92$;

$p=0.004$) and MAGL ($t_4= 9.27$; $p<0.001$) in the mPFC of ethanol-exposed rats (**Fig. 3A**). Regarding the glutamatergic receptors, Reboxetine also decreased the protein levels of GluN1 ($t_4= 7.36$; $p=0.0018$) and mGlu5 ($t_4= 3.50$; $p=0.024$) in the mPFC of ethanol-exposed rats (**Fig. 3B**). Reference samples of Western blots are depicted in **Figs. 3C and 3D**.

Effects of Reboxetine on the mRNA levels of cannabinoid/acylethanolamide system-related components in the dorsal hippocampus

Reboxetine did not affect the gene expression of cannabinoid/acylethanolamide system-related components in the dorsal hippocampus of ethanol-exposed rats (**Fig. 4A**).

Effects of Reboxetine on the mRNA levels of glutamatergic system-related elements in the dorsal hippocampus

Reboxetine decreased the mRNA levels of *GluN1* ($t_{12}= 2.68$; $p=0.019$) and *GluN2b* ($t_{12}= 2.22$; $p=0.045$) and increased the mRNA levels of *GluA2* ($t_{12}= 3.25$; $p=0.006$) and *mGlu3* ($t_{12}= 2.41$; $p=0.032$) in the dorsal hippocampus of ethanol-exposed rats (**Fig. 4B**). No changes in mRNA levels of *Gls1*, *Gls2*, *GluN2a*, *GluN2c*, *GluA1*, *GluA3*, *GluA4*, *mGlu5* and *Slc1a1* were found in the dorsal hippocampus of the Reboxetine-treated rats when compared with vehicle.

Effects of Reboxetine on the expression of selected proteins of the cannabinoid/acylethanolamide system and glutamatergic receptors in the dorsal hippocampus

Following the previous results of mRNA levels, we evaluated the protein expression of selected elements of the cannabinoid/acylethanolamide system and glutamatergic receptors in the dorsal hippocampus of either Reboxetine and vehicle-exposed rats at the end of the third week of

relapse. Regarding the cannabinoid/acylethanolamide system, Reboxetine only decreased the protein levels of DAGL α ($t_4 = 2.64$; $p = 0.05$) in the dorsal hippocampus, without affecting the expression of the remaining proteins analyzed (**Fig. 5A**). Regarding the glutamatergic receptors, Reboxetine decreased the protein levels of GluN1 ($t_4 = 2.68$; $p = 0.05$), GluA1 ($t_4 = 3.29$; $p = 0.035$) and mGlu5 ($t_4 = 11.61$; $p = 0.0003$) in the dorsal hippocampus of ethanol-exposed rats (**Fig. 5B**). Reference samples of Western blots are depicted in **Figs. 5C and 5D**.

Effects of Reboxetine on the mRNA expression of cannabinoid/acylethanolamide system-related components in the amygdala

Reboxetine increased the mRNA levels of the cannabinoid/acylethanolamide-related signaling genes *Ppara* ($t_{10} = 2.27$; $p = 0.046$) and *Faah* ($t_{10} = 2.50$; $p = 0.031$) in the amygdala of ethanol-exposed rats (**Fig. S1A**).

Effects of Reboxetine on the mRNA levels of glutamatergic system-related elements in the amygdala

Reboxetine increased the mRNA levels of *Gls2* ($t_{10} = 2.40$; $p = 0.037$), *GluA1* ($t_{11} = 2.52$; $p = 0.028$), and *GluA4* ($t_{11} = 2.86$; $p = 0.015$) in the amygdala of ethanol-exposed rats (**Fig. S1B**). No changes in mRNA levels of *Gls1*, *GluN1*, *GluN2a*, *GluN2b*, *GluN2c*, *GluA2*, *GluA3*, *mGlu3*, *mGlu5* and *Slc1a1* were found in the amygdala of the Reboxetine-treated rats when compared with vehicle. Because of the small amount of tissue available, no protein determinations were done.

DISCUSSION

The interruption of the administration of the noradrenaline selective reuptake inhibitor Reboxetine along alcohol deprivation resulted in a clear escalation of alcohol self-administration that extends at least for three weeks. Alcohol consumption increased two-fold, suggesting that this enhanced alcohol-seeking behavior is extending beyond the potential acute withdrawal effects derived of reboxetine treatment cessation. This sole observation, together with other reports showing similar effects derived of abrupt cessations of SSRI (fluoxetine) or dual antidepressants (i.e. venlafaxine and atomoxetine, Alen et al., 2013 and 2014) is sufficiently relevant to stress the importance of monitoring adherence to antidepressant treatment in AUD-MD patients if there is a risk of therapy drop out and alcohol intake reinstatement. We are aware that reboxetine is not a primary election in MD associated or not to AUD, and that meta-analysis published indicates poor clinical outcomes and low adherence with enhanced drop outs for this particular antidepressant (Cipriani et al., 2018). However, we use it as a pharmacological strategy to show that the enhanced alcohol intake observed after relapse is not only a problem observed with SSRI-type of antidepressants, but rather present also when noradrenergic uptake system is inhibited by the antidepressant selected. There is a clear need to study whether cycles of drop outs from antidepressant therapy in relapsing AUD patients contribute to the progression of alcohol addiction.

The enhanced alcohol consumption observed after reboxetine or fluoxetine treatment interruption has similarities with those observed after the administration of cannabinoids (Lopez-Moreno et al., 2004a), nicotine (Lopez-Moreno et al., 2004b) and the psychostimulant MDMA (Moreno-Sanz et al., 2009). These three drugs of abuse are capable of inducing noradrenaline and/or serotonin release in their terminal fields, including the medial prefrontal cortex (mPFC) (White et

al., 1996; Rao et al., 2003; Page et al., 2008). Thus, it is possible that enhanced noradrenaline/serotonin release along alcohol deprivation might result in long-lasting adaptations that might favor alcohol seeking behavior. In order to gain insights on potential mechanisms involved in long-lasting neuroadaptions to alcohol we selected the cannabinoid/acylethanolamide signaling system and the glutamatergic system, whose activity is tightly regulated by endogenous cannabinoid signaling (Piomelli, 2003). Both, glutamate and endocannabinoid transmission have been described to contribute to alcohol seeking behavior and alcohol addiction (Cipitelli et al., 2005; Vangeliene et al., 2008), and its potential involvement in the actions of reboxetine is additionally supported by the role of cannabinoid receptors in noradrenaline release and the functional interaction between noradrenergic and glutamatergic transmission in the regulation of prefronto-cortical pyramidal cells (Law-Thomas et al., 1993; Zhang et al., 2013).

The analysis of mRNA and protein expression in the mPFC and HIP of reboxetine-treated animals, revealed a profound dysregulation of the endogenous cannabinoid system mainly in the mPFC. Measures were done 1 hour after the last self-administration session, and we cannot discard that the effects observed in relation with vehicle-treated animals self-administering alcohol might be related to the enhanced alcohol intake observed in the reboxetine-treated animals. However, since measures were done both at mRNA and protein levels, it is reasonable to think that the biochemical alterations are a combination of the long-term actions of reboxetine associated with the long-term consequences of enhanced alcohol intake. This limitation will be addressed in future time-course studies. The most consistent finding observed was the inhibition of the mRNA and protein expression of DAGL α , the main enzyme responsible for 2-arachidonoyl glycerol (2-AG) synthesis. This was observed at the protein level in the mPFC and hippocampus, although it could not be evaluated in the AMY. This decrease might be consistent

with a reduced retrograde inhibition of glutamatergic terminals, potentially leading to an overactive glutamatergic system. This is further supported by the reduced expression of cannabinoid CB1 receptors, as well as that of the second enzyme synthesizing 2-AG, DAGL α . The reduced presence of MAGL, the main degradation enzyme for 2-AG, might indicate an attempt of compensation of 2-AG deficit. However, in the absence of measures of extracellular 2-AG concentrations, this hypothesis has to be taken cautiously. The reduction of DAGL α in the hippocampus was the only effect observed at protein level, and no effects on the mRNA expression of the cannabinoid/acylethanolamide signaling system. This specificity of action of reboxetine on the endogenous cannabinoid system in the mPFC points to a crucial role of this brain area in regulating alcohol intake. The present data further supports previous findings on alcohol accepting strain of rats (Hansson et al., 2006). Finally, we observed a reduction of PPAR α protein in the mPFC. This nuclear receptor is the endogenous target for oleoylethanolamide, a non-cannabinoid receptor acting acylethanolamide that is enhanced along alcohol abuse in rodents (Bilbao et al., 2016), showing antidepressant properties (Anton et al., 2016) and that seems to be linked to the antidepressant activity of SSRIs (Romero-Sanchiz et al., 2019). The significance of this finding remains to be studied. The expression of the mRNA of endogenous cannabinoid system-related genes in the AMY has a differential profile when compared to that observed in the mPFC and HIP. This differential expression was difficult to interpretate in the absence of protein data. However, the increased expression of FAAH points also to a deficient endocannabinoid signaling in the AMY that was described after chronic alcohol exposure and that has been proposed to contribute to stress/anxiety-driven alcohol relapse (Serrano et al., 2018). Further research is needed to identify whether reboxetine might be able of altering the endogenous cannabinoid system in the AMY.

Regarding glutamate transmission, we observed a very similar pattern of protein expression in the mPFC and the HIP, with a decrease of the N-methyl-D-Aspartate (NMDA) receptor subunit 1, a reduction (only significant in the HIP) of the AMPA A1 subunit, and a reduction of the metabotropic glutamate receptor 5 (mGlu5). At the mRNA level, the analysis of the expression of glutamate genes pointed to an upregulation of the expression of AMPA subunit 2, as a common marker of reboxetine exposure. Again, we cannot discard that these effects may have a component derived of the enhanced alcohol intake. Interestingly, mGlu5 receptors have been described to control the retrograde inhibitory actions of endocannabinoids by activating 2-AG production (Varma et al., 2001; Piomelli, 2003) and limiting its action on presynaptic cannabinoid CB1 receptors (Colmers and Bains, 2018). It is reasonable to think that reboxetine-associated dysregulation of mGlu5 activity might account for the impaired endocannabinoid signaling deduced from protein expression analysis in reboxetine-treated animals. Regarding the decreased expression of NMDA GluN1 and AMPA GluA1 protein subunits, the decrease observed might be a desensitization response to an overactive glutamatergic signaling system, although without actual binding studies we cannot confirm this assumption. GluN1 contains the active site for ethanol, so it can be directly regulated by its intake. However, the present data regarding GluA1 subunit is opposite to that described after chronic alcohol exposure, where an increase in the synaptic presence of this protein has been identified (Chandler et al., 1999; Chen et al., 1999). Whether this decrease reflects a change in the constitution of AMPA receptors to respond to overactive glutamatergic system, or it is the result of reboxetine withdrawal remains to be determined. Interestingly, while noradrenaline facilitates GluA1 incorporation to the synaptic membranes by promoting its phosphorylation (HU et al., 2007), a mechanism that can be potentially reversed after reboxetine withdrawal, alcohol, through the enhanced intestinal

permeability of LPS, might result in down-regulation of AMPA receptors containing GluA1 protein through a noradrenergic-dependent mechanism (Sekio and Seki, 2014).

The actual significance – i.e. cause or consequence of enhanced alcohol drinking- of either, the dysregulated expression of the endogenous cannabinoid signaling system, or the reduced expression of GluN1, GluA1 and mGlu5 displayed by animals pretreated with reboxetine cannot be clearly deducted from the present data. However, these results clearly support the notion that abrupt cessation of antidepressant therapy along alcohol deprivation periods must be controlled and adherence to this type of treatment monitored in order to avoid potential unwanted effects that might further complicate the clinical course of alcohol addiction.

STATEMENTS OF INTEREST

There are no actual or potential conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

Fulbright Visiting Scholar Program, United States Department of State, Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (JS: CAS16/00038); RETICS Red de Trastornos Adictivos, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) and European Regional Development Funds-European Union (ERDF-EU) (FRF: RD16/0017/0001); Plan Nacional sobre Drogas, Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (FRF: PNSD2018I044; JS: PNSD2015/047; LO PNSD2015/005; AS: PND2017/043); Instituto de Salud Carlos III, MINECO co-funded by ERDF-EU (FRF: PI16/01698; AS: PI17/02026); JS holds a “Miguel Servet II” research contract from the National System of Health, ISCIII, ERDF-EU (CP117/00024); AS and FJP hold a “Miguel Servet I” research contract funded by ISCIII and ERDF-EU (CP14/00173 and CP14/00212, respectively).

REFERENCES

- Alén F, Orio L, Gorriti MÁ, de Heras RG, Ramírez-López MT, Pozo MÁ, de Fonseca FR (2013) Increased alcohol consumption in rats after subchronic antidepressant treatment. *Int J Neuropsychopharmacol* 16:1809-18.
- Alén F, Santos A, Moreno-Sanz G, González-Cuevas G, Giné E, Franco-Ruiz L, Navarro M, López-Moreno JA (2009) Cannabinoid-induced increase in relapse-like drinking is prevented by the blockade of the glycine-binding site of N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroscience* Jan 23;158(2):465-73.
- Alén F, Serrano A, Gorriti MÁ, Pavón FJ, Orio L, de Heras RG, Ramírez-López MT, Antón M, Pozo MÁ, Rodríguez de Fonseca F (2014) The administration of atomoxetine during alcohol deprivation induces a time-limited increase in alcohol consumption after relapse. *Int J Neuropsychopharmacol* Nov;17(11):1905-10.
- Antón M, Alén F, Gómez de Heras R, Serrano A, Pavón FJ, Leza JC, García-Bueno B, Rodríguez de Fonseca F, Orio L (2017) Oleoylethanolamide prevents neuroimmune HMGB1/TLR4/NF- κ B danger signaling in rat frontal cortex and depressive-like behavior induced by ethanol binge administration. *Addict Biol*. 22:724-741.
- Auclair N, Otani S, Soubrie P, Crepel F (2000) Cannabinoids modulate synaptic strength and plasticity at glutamatergic synapses of rat prefrontal cortex pyramidal neurons. *J Neurophysiol* Jun;83(6):3287-93.
- Belujon P and Grace AA (2011) Hippocampus, amygdala, and stress: interacting systems that affect susceptibility to addiction. *Ann N Y Acad Sci* Jan;1216:114-21.
- Bilbao A, Serrano A, Cippitelli A, Pavón FJ, Giuffrida A, Suárez J, García-Marchena N, Baixeras E, Gómez de Heras R, Orio L, Alén F, Ciccocioppo R, Cravatt BF, Parsons LH, Piomelli D, Rodríguez de Fonseca F (2016) Role of the satiety factor oleoylethanolamide in alcoholism. *Addict Biol* Jul;21(4):859-72.
- Blanco E, Galeano P, Palomino A, Pavón FJ, Rivera P, Serrano A, Alén F, Rubio L, Vargas A, Castilla-Ortega E, Decara J, Bilbao A, de Fonseca FR, Suárez J (2016) Cocaine-induced behavioral sensitization decreases the expression of endocannabinoid signaling-related proteins in the mouse hippocampus. *Eur Neuropsychopharmacol* Mar;26(3):477-92.
- Blanco-Gandía MC and Rodríguez-Arias M (2018) Pharmacological treatments for opiate and alcohol addiction: A historical perspective of the last 50 years. *Eur J Pharmacol* Oct 5;836:89-101.
- Borodovitsyna O, Flamini M, Chandler D (2017) Noradrenergic Modulation of Cognition in Health and Disease. *Neural Plast* 6031478.
- Chandler LJ, Norwood D, Sutton G (1999) Chronic ethanol upregulates NMDA and AMPA, but not kainate receptor subunit proteins in rat primary cortical cultures. *Alcohol Clin Exp Res* 23:363– 370.

- Chen F, Jarrott B, Lawrence AJ (1999) Upregulation of cortical AMPA receptor binding in the fawn-hooded rat following ethanol withdrawal. *Eur J Pharmacol* 384:139–146.
- Ch'Ng SS and Lawrence AJ (2018) Investigational drugs for alcohol use disorders: a review of preclinical data. *Expert Opin Investig Drugs* May;27(5):459-474.
- Cippitelli A, Bilbao A, Hansson AC, del Arco I, Sommer W, Heilig M, Massi M, Bermúdez-Silva FJ, Navarro M, Ciccocioppo R, de Fonseca FR; European TARGALC Consortium (2005) Cannabinoid CB1 receptor antagonism reduces conditioned reinstatement of ethanol-seeking behavior in rats. *Eur J Neurosci* 21:2243-51.
- Cipriani A, Furukawa TA, Salanti G, Chaimani A, Atkinson LZ, Ogawa Y, Leucht S, Ruhe HG, Turner EH, Higgins JPT, Egger M, Takeshima N, Hayasaka Y, Imai H, Shinohara K, Tajika A, Ioannidis JPA, Geddes JR (2018) Comparative efficacy and acceptability of 21 antidepressant drugs for the acute treatment of adults with major depressive disorder: a systematic review and network meta-analysis. *Lancet* Apr 7;391(10128):1357-1366.
- Colmers PLW and Bains JS (2018) Presynaptic mGluRs Control the Duration of Endocannabinoid-Mediated DSI. *J Neurosci* Dec 5;38(49):10444-10453.
- Delgado PL and Moreno FA (2000) Role of norepinephrine in depression. *J Clin Psychiatry*. 2000;61 Suppl 1:5-12.
- Ferrer B, Bermúdez-Silva FJ, Bilbao A, Alvarez-Jaimes L, Sanchez-Vera I, Giuffrida A, Serrano A, Baixeras E, Khaturia S, Navarro M, Parsons LH, Piomelli D, Rodríguez de Fonseca F. Regulation of brain anandamide by acute administration of ethanol. *Biochem J* May 15;404(1):97-104.
- Deussing JM (2006) Animal models of depression. *Drug Discovery Today: Disease Models* 3:375-383
- Ferrer B, Bermúdez-Silva FJ, Bilbao A, Alvarez-Jaimes L, Sanchez-Vera I, Giuffrida A, Serrano A, Baixeras E, Khaturia S, Navarro M, Parsons LH, Piomelli D, Rodríguez de Fonseca F (2007) Regulation of brain anandamide by acute administration of ethanol. *Biochem J* May 15;404(1):97-104.
- Furini CRG, Behling JAK, Zinn CG, Zanini ML, Assis Brasil E, Pereira LD, Izquierdo I, de Carvalho Myskiw J (2017) Extinction memory is facilitated by methylphenidate and regulated by dopamine and noradrenaline receptors. *Behav Brain Res* May 30;326:303-306.
- García-Marchena N, Araos P, Pavón FJ, Ponce G, Pedraz M, Serrano A, Arias F, Romero-Sanchiz P, Suárez J, Pastor A, De la Torre R, Torrens M, Rubio G, Rodríguez de Fonseca F (2016) Psychiatric comorbidity and plasma levels of 2-acyl-glycerols in outpatient treatment alcohol users. Analysis of gender differences. *Adicciones* Sep 29;29(2):83-96.
- Hansson AC, Bermúdez-Silva FJ, Malinen H, Hyytiä P, Sanchez-Vera I, Rimondini R, Rodriguez de Fonseca F, Kunos G, Sommer WH, Heilig M (2007) Genetic impairment of

frontocortical endocannabinoid degradation and high alcohol preference. *Neuropsychopharmacology* Jan;32(1):117-26.

- Hermann D, Weber-Fahr W, Sartorius A, Hoerst M, Frischknecht U, Tunc-Skarka N, Perreault-Lenz S, Hansson AC, Krumm B, Kiefer F, Spanagel R, Mann K, Ende G, Sommer WH (2012) Translational magnetic resonance spectroscopy reveals excessive central glutamate levels during alcohol withdrawal in humans and rats. *Biol Psychiatry* Jun 1;71(11):1015-21.
- Holmes A, Spanagel R, Krystal JH (2013) Glutamatergic targets for new alcohol medications. *Psychopharmacology (Berl)* Oct;229(3):539-54.
- Hu H, Real E, Takamiya K, Kang MG, Ledoux J, Huganir RL, Malinow R (2007) Emotion enhances learning via norepinephrine regulation of AMPA-receptor trafficking. *Cell* Oct 5;131(1):160-73.
- Koob GF and Mason BJ (2016) Existing and Future Drugs for the Treatment of the Dark Side of Addiction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 56:299-322
- Law-Tho D, Crepel F, Hirsch JC (1993) Noradrenaline decreases transmission of NMDA- and non-NMDA-receptor mediated monosynaptic EPSPs in rat prefrontal neurons in vitro. *Eur J Neurosci* Nov 1;5(11):1494-500
- López-Moreno JA, González-Cuevas G, Rodríguez de Fonseca F, Navarro M (2004a) Long-lasting increase of alcohol relapse by the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 during alcohol deprivation. *J Neurosci* Sep 22;24(38):8245-52.
- López-Moreno JA, Trigo-Díaz JM, Rodríguez de Fonseca F, González Cuevas G, Gómez de Heras R, Crespo Galán I, Navarro M (2004b) Nicotine in alcohol deprivation increases alcohol operant self-administration during reinstatement. *Neuropharmacology* Dec;47(7):1036-44.
- Mantsch JR, Baker DA, Funk D, Lê AD, Shaham Y (2016) Stress-Induced Reinstatement of Drug Seeking: 20 Years of Progress. *Neuropsychopharmacology* Jan;41(1):335-56.
- Moreno-Sanz G, O'Shea E, Orio L, Escobedo I, González-Cuevas G, Navarro M, Colado MI, López-Moreno JA (2009) Administration of MDMA to ethanol-deprived rats increases ethanol operant self-administration and dopamine release during reinstatement. *Int J Neuropsychopharmacol* Aug;12(7):929-40.
- Morilak DA, Barrera G, Echevarria DJ, Garcia AS, Hernandez A, Ma S, Petre CO (2005) Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* Dec;29(8):1214-24.
- Oliva V, Cartoni E, Latagliata EC, Puglisi-Allegra S, Baldassarre G (2018) Interplay of prefrontal cortex and amygdala during extinction of drug seeking. *Brain Struct Funct* Apr;223(3):1071-1089.

- Page ME, Oropeza VC, Van Bockstaele EJ (2008) Local administration of a cannabinoid agonist alters norepinephrine efflux in the rat frontal cortex. *Neurosci Lett* Jan 24;431(1):1-5.
- Palpacuer C, Duprez R, Huneau A, Locher C, Boussageon R, Laviolle B, Naudet F (2018) Pharmacologically controlled drinking in the treatment of alcohol dependence or alcohol use disorders: a systematic review with direct and network meta-analyses on nalmefene, naltrexone, acamprosate, baclofen and topiramate. *Addiction* Feb;113(2):220-237.
- Piomelli D (2003) The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* Nov;4(11):873-84.
- Rao TS, Correa LD, Adams P, Santori EM, Sacaan AI (2003) Pharmacological characterization of dopamine, norepinephrine and serotonin release in the rat prefrontal cortex by neuronal nicotinic acetylcholine receptor agonists. *Brain Res* Nov 14;990(1-2):203-8.
- Ray LA, Bujarski S, Roche DJO, Magill M (2018) Overcoming the "Valley of Death" in Medications Development for Alcohol Use Disorder. *Alcohol Clin Exp Res* Sep;42(9):1612-1622.
- Richter H, Teixeira FM, Ferreira SG, Kittel Á, Köfalvi A, Sperlágh B (2012) Presynaptic α_2 -adrenoceptors control the inhibitory action of presynaptic CB₁ cannabinoid receptors on prefrontocortical norepinephrine release in the rat. *Neuropharmacology* Oct;63(5):784-97.
- Rogowski A, Kostowski W, Bienkowski P (2002) Sucrose self-administration predicts only initial phase of ethanol-reinforced behaviour in Wistar rats. *Alcohol and Alcoholism* 37:436-440
- Romero-Sanchiz P, Nogueira-Arjona R, Pastor A, Araos P, Serrano A, Boronat A, Garcia-Marchena N, Mayoral F, Bordallo A, Alen F, Suárez J, de la Torre R, Pavón FJ, Rodríguez de Fonseca F (2019) Plasma concentrations of oleoylethanolamide in a primary care sample of depressed patients are increased in those treated with selective serotonin reuptake inhibitor-type antidepressants. *Neuropharmacology* May 1;149:212-220.
- Russell VA, Sagvolden T, Johansen EB (2005) Animal models of attention-deficit hyperactivity disorder. *Behav Brain Funct* 1:9
- Samson HH and Czachowski CL (2003) Behavioral measures of alcohol self-administration and intake control: rodent models. *Int Rev Neurobiol* 54:107-43.
- Samson HH, Sharpe AL, Denning C (1999) Initiation of ethanol self-administration in the rat using sucrose substitution in a sipper-tube procedure. *Psychopharmacology (Berl)* 147:274-279
- Sekio M and Seki K (2014) Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is associated with α_1 -adrenoceptor dependent downregulation of the membrane GluR1 subunit in the

mouse medial prefrontal cortex and ventral tegmental area. *Int J Neuropsychopharmacol* Oct 31;18(1)

- Serrano A, Pavon FJ, Buczynski MW, Schlosburg J, Natividad LA, Polis IY, Stouffer DG, Zorrilla EP, Roberto M, Cravatt BF, Martin-Fardon R, Rodriguez de Fonseca F, Parsons LH (2018) Deficient endocannabinoid signaling in the central amygdala contributes to alcohol dependence-related anxiety-like behavior and excessive alcohol intake. *Neuropsychopharmacology* Aug;43(9):1840-1850.
- Soeters HS, Howells FM, Russell VA (2008) Methylphenidate does not increase ethanol consumption in a rat model for attention-deficit hyperactivity disorder-the spontaneously hypertensive rat. *Metab Brain Dis* 23:303-314.
- Torrens M, Fonseca F, Mateu G, Farré M (2005) Efficacy of antidepressants in substance use disorders with and without comorbid depression *Drug & Alcohol Dependence* 78:1-22
- Varma N, Carlson GC, Ledent C, Alger BE (2001) Metabotropic glutamate receptors drive the endocannabinoid system in hippocampus. *J Neurosci* Dec 15;21(24):RC188.
- Vengeliene V, Bilbao A, Molander A, Spanagel R (2008) Neuropharmacology of alcohol addiction. *Br J Pharmacol* May;154(2):299-315.
- Vengeliene V, Bilbao A, Spanagel R (2014) The alcohol deprivation effect model for studying relapse behavior: a comparison between rats and mice. *Alcohol* 48:313-320
- White SR, Obradovic T, Imel KM, Wheaton MJ (1996) The effects of methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "Ecstasy") on monoaminergic neurotransmission in the central nervous system. *Prog Neurobiol* Aug;49(5):455-79.
- Willner P (1991) Behavioural models in psychopharmacology: theoretical, industrial and clinical perspectives. pp 89–175. Cambridge: Cambridge University Press.
- World Health Organization (2018) Global Status Report on Alcohol and Health <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274603/9789241565639-eng.pdf> accessed at 19 march 2019
- Zhang Z, Cordeiro Matos S, Jegu S, Adamantidis A, Séguéla P (2013) Norepinephrine drives persistent activity in prefrontal cortex via synergistic $\alpha 1$ and $\alpha 2$ adrenoceptors. *PLoS One* Jun 13;8(6):e66122.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. (A) Experimental design of the model of ethanol consumption and treatment with vehicle or the noradrenaline uptake inhibitor Reboxetine during ethanol deprivation. **(B)** Daily week ethanol consumption along baseline pre-treatment week and after three consecutive weeks post-reboxetine treatment **(C)**. Weekly average of ethanol intake by operant self-administration in the rats treated with vehicle or Reboxetine along three consecutive weeks. Data are the average (5-days) of daily ethanol intake, \pm SEM ($n=8$ /group). *Post hoc* analysis: $^{*}/^{**}/^{***}p<0.05/0.01$ vs. vehicle group.

Figure 2. Relative mRNA levels of cannabinoid/acylethanolamide **(A)** and glutamatergic **(B)** signaling system-related genes in the mPFC of adult rats exposed to ethanol self-administration and treated with vehicle or the noradrenaline uptake inhibitor Reboxetine (15 mg/kg for two weeks). Bars represent the means \pm SEM (Vehicle, $n=8$; Reboxetine, $n=8$). Student's *t* test: $^{*}p<0.05$ vs. vehicle group.

Figure 3. Relative protein levels of selected components of the cannabinoid/acylethanolamide **(A)** and glutamatergic **(B)** signaling system in the mPFC of adult rats exposed to ethanol self-administration and treated with vehicle or the noradrenaline uptake inhibitor Reboxetine (15 mg/kg for two weeks). Representative immunoblots of respective proteins were also shown **(C, D)**. Bars represent the means \pm SEM ($n=3$ /group). Student's *t* test: $^{*}/^{**}/^{***}p<0.05/0.01/0.001$ vs. vehicle group.

Figure 4. Relative mRNA levels of cannabinoid/acylethanolamide **(A)** and glutamatergic **(B)** signaling system-related genes in the dorsal hippocampus of adult rats exposed to ethanol self-

administration and treated with vehicle or the noradrenaline uptake inhibitor Reboxetine (15 mg/kg for two weeks). Bars represent the means \pm SEM (Vehicle, $n=8$; Reboxetine, $n=8$). Student's t test: $*/**p<0.05/0.01$ vs. vehicle group.

Figure 5. Relative protein levels of selected components of the cannabinoid/acylethanolamide (A) and glutamatergic (B) signaling system in the dorsal hippocampus of adult rats exposed to ethanol self-administration and treated with vehicle or the noradrenaline uptake inhibitor Reboxetine (15 mg/kg for two weeks). Representative immunoblots of respective proteins were also shown (C, D). Bars represent the means \pm SEM ($n=3$ /group). Student's t test: $*/***p<0.05/0.001$ vs. vehicle group.

For Review Only

SUPPLEMENTARY MATERIALS

A. SUPPLEMENTARY TABLES

Table S1. Mean daily lever press at active and inactive levers measured in the last week previous to alcohol deprivation/reboxetine treatment.

Last Baseline Week

	M	T	W	T	F
Mean of Active Lever Presses	32,2	32,2	33,7	23,3	30,4
SEM	3,971895	3,844906	4,036383	2,67445	3,020238
Mean of Inactive Lever Presses	1,29	1,12	0,82	1,88	0,76
SEM	0,294118	0,240746	0,214121	0,541528	0,278248

Table S2. Primer references for Taqman® Gene Expression Assays.

Gene symbol	Assay ID	GenBank accession number	Amplicon length (bp)
<i>Actb</i>	Rn00667869_m1	NM_0311443	91
<i>Cnr1 (CB1)</i>	Rn02758689_s1	NM_012784.4	92
<i>Cnr2 (CB2)</i>	Rn01637601_m1	NM_020543.4	68
<i>Ppara</i>	Rn00566193_m1	NM_013196.1	98
<i>Pparγ</i>	Rn00440945_m1	NM_013124.3	63
<i>Nape-pld</i>	Rn01786262_m1	NM_199381.1	71
<i>Faah</i>	Rn00577086_m1	NM_024132.3	63
<i>Dagla</i>	Rn01454304_m1	NM_001005886.1	67
<i>Daglβ</i>	Rn01453771_m1	NM_001107120.1	98
<i>Mgll (MAGL)</i>	Rn00593297_m1	NM_138502.2	78
<i>Gls1 (kidney-type)</i>	Rn00561285_m1	NM_001109968.1	80
<i>Gls2 (liver-type)</i>	Rn00594296_m1	NM_001270786.1	58
<i>Grin1 (GluN1)</i>	Rn01436034_m1	NM_001270602.1	73
<i>Grin2a (GluN2a)</i>	Rn00561341_m1	NM_012573.3	68
<i>Grin2b (GluN2b)</i>	Rn00680474_m1	NM_012574.1	79
<i>Grin2c (GluN2c)</i>	Rn00561359_m1	NM_012575.3	57
<i>Gria1 (GluA1)</i>	Rn00709588_m1	NM_031608.1	85
<i>Gria2 (GluA2)</i>	Rn00568514_m1	NM_001083811.1	122
<i>Gria3 (GluA3)</i>	Rn00583547_m1	NM_001112742.1	74
<i>Gria4 (GluA4)</i>	Rn00568544_m1	NM_001113184.1	76
<i>Grm3 (mglu3)</i>	Rn01755349_m1	NM_001105712.1	71
<i>Grm5 (mGlu5)</i>	Rn005666628_m1	NM_017012.1	112
<i>Slc1a1 (EAAAC1)</i>	Rn00564705_m1	NM_013032.3	92

Actb, beta actin; *CB1*, cannabinoid receptor 1; *CB2*, cannabinoid receptor 2; *Ppara*, peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR- α); *Pparγ*, peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ); *Nape-pld*, N-acyl phosphatidyl ethanolamine phospholipase D (NAPE-PLD); *Faah*, fatty acid amide hydrolase (FAAH); *Dagla/b*, diacylglycerol lipase alpha/beta (DAGL α/β); *Mgll*, monoglyceride lipase (MAGL); *Gls1*, kidney-type glutaminase isoform (KGA); *Gls2*, liver-type glutaminase isoform (LGA); *GluN1/2a/2b/2c*, NMDA-ionotropic glutamatergic receptors (NR1/2A/2B/2C); *GluA1/2/3/4*, AMPA-ionotropic receptor subunits; *mGlu3/5*, metabotropic glutamatergic receptors; *Slc1a1*, glutamate transporter (EAAC1).

Table S2. Primary antibodies used for Western blotting

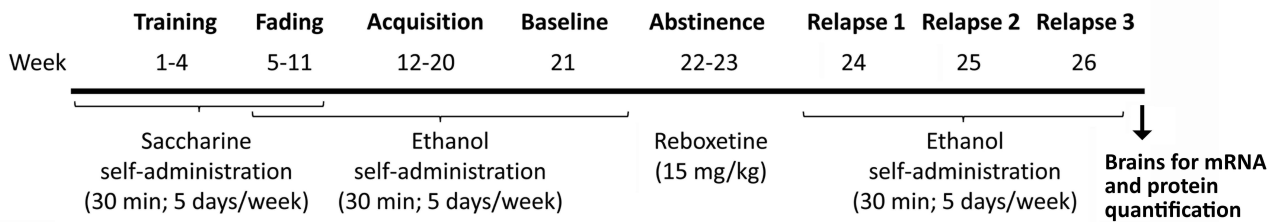
Antigen	Immunogen	Manufacturing details	Dilution
CB ₁ (cannabinoid receptor I)	Synthetic peptide corresponding to C terminal aa 461-472 of human CB1 (MSVSTDTSAEAL)	Rabbit polyclonal antibody Abcam Cat. no. ab23703	1:200
CB ₂ (cannabinoid receptor II)	Fusion protein corresponding to aa 1-32 of rat CB2	Rabbit polyclonal antibody Abcam Cat. no. ab3561	1:200
PPAR α (peroxisome proliferator activated receptor α)	Synthetic peptide corresponding to MVDTESPICPLSPLEADD	Rabbit polyclonal antibody Fitzgerald Cat. no. RDI-PPARAabrx	1:500
PPAR γ (peroxisome proliferator activated receptor γ)	Sequence mapping at the C-terminus of human PPAR γ .	Mouse monoclonal antibody Santa Cruz sc-7273	1:200
DAGL α (diacylglycerol lipase α)	Synthetic peptide from C-terminal region of rat DAGL α (CGASPTKQDDLVISAR)	Rabbit polyclonal antibody Developed in our lab	1:100
DAGL β (diacylglycerol lipase β)	Synthetic peptide from internal sequence of rat DAGL β (SSDSPLDSPTKYPTLC)	Rabbit polyclonal antibody Developed in our lab	1:50
MAGL (monoacylglycerol lipase)	Synthetic peptide corresponding to aa 1-14 of human MAGL (MPEESSPRRTPQSI)	Rabbit polyclonal antibody Cayman Cat. no. 100035	1:200
GluN1 (NMDA glutamate receptor subunit NR1)	Fusion protein containing the exon 5 splice variant of human NR1	Mouse monoclonal antibody SIGMA Cat. no. M-207	1:100
GluA1 (AMPA receptor subunit 1)	Synthetic peptide corresponding to aa residues 271-285 of rat AMPAR1 (RTSDSRDHTRVDWKR)	Rabbit polyclonal antibody ThermoFisher Cat. no. PA5-77415	1:200
mGlu5 (metabotropic glutamate receptor isoform 5)	Synthetic peptide corresponding to residues YDRRLAQHKSEIE of mGluR5	Rabbit polyclonal antibody ThermoFisher Cat. no. PA1-24637	1:500

SUPPLEMENTARY FIGURE 1

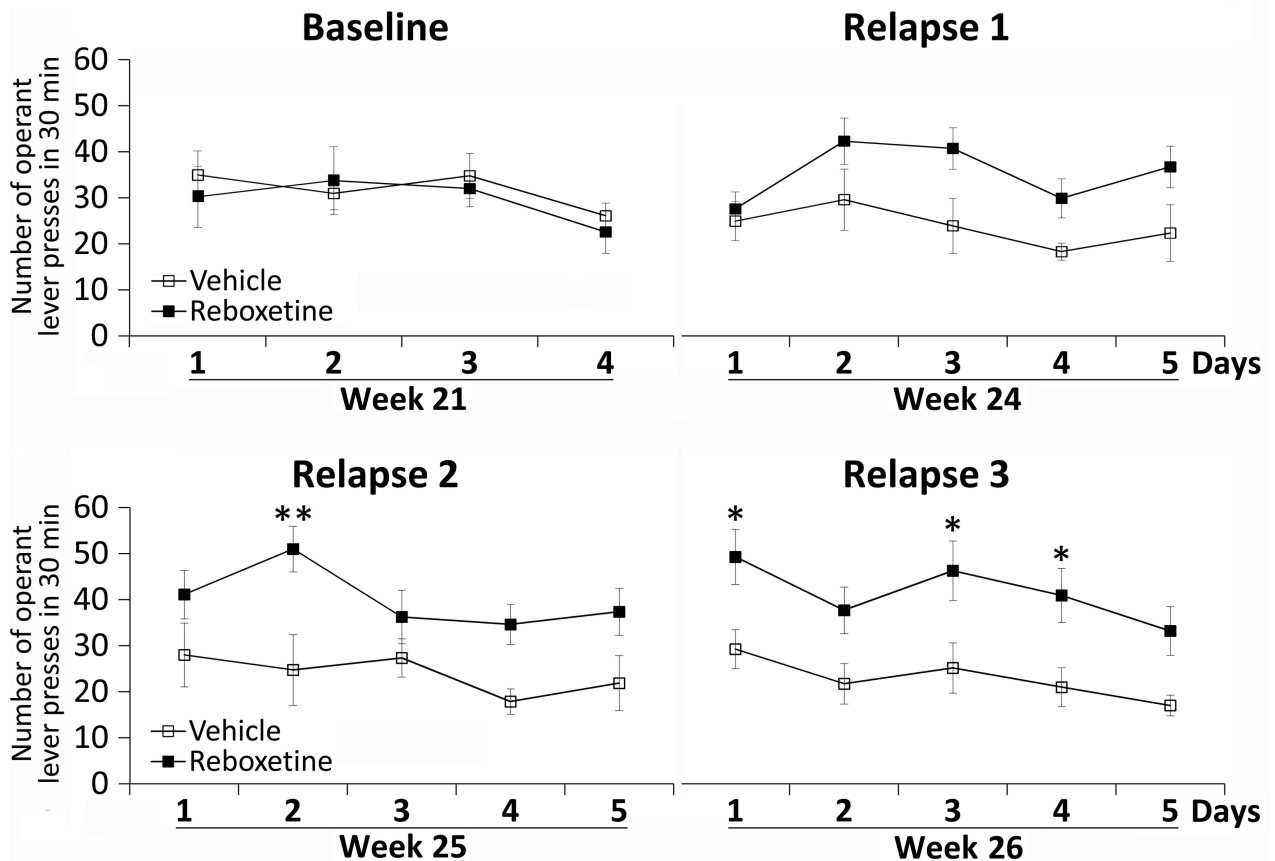
Figure S1. Relative mRNA levels of cannabinoid/acylethanolamide (**A**) and glutamatergic (**B**) signaling system-related genes in the amygdala of adult rats exposed to ethanol self-administration and treated with vehicle or the noradrenaline uptake inhibitor Reboxetine (15 mg/kg for two weeks). Bars represent the means \pm SEM (Vehicle, $n=8$; Reboxetine, $n=6$). Student's t test: $*p<0.05$ vs. vehicle group.

For Review Only

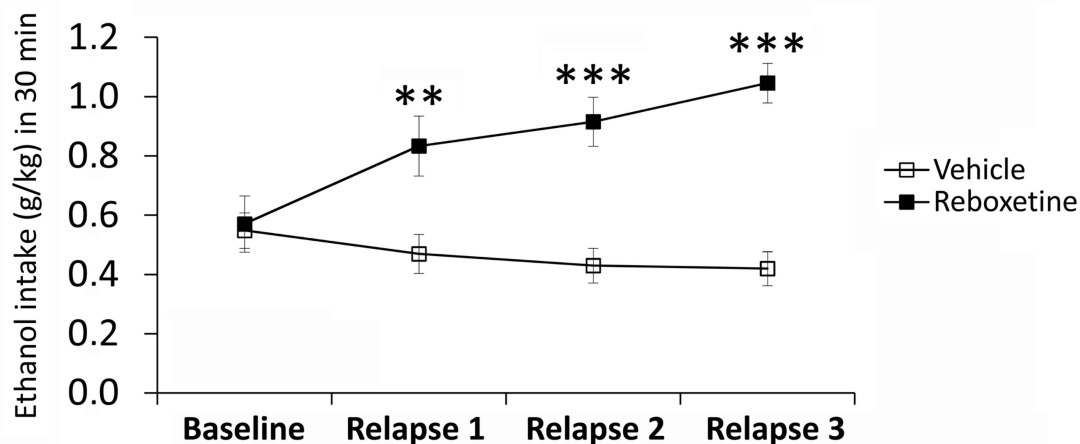
A

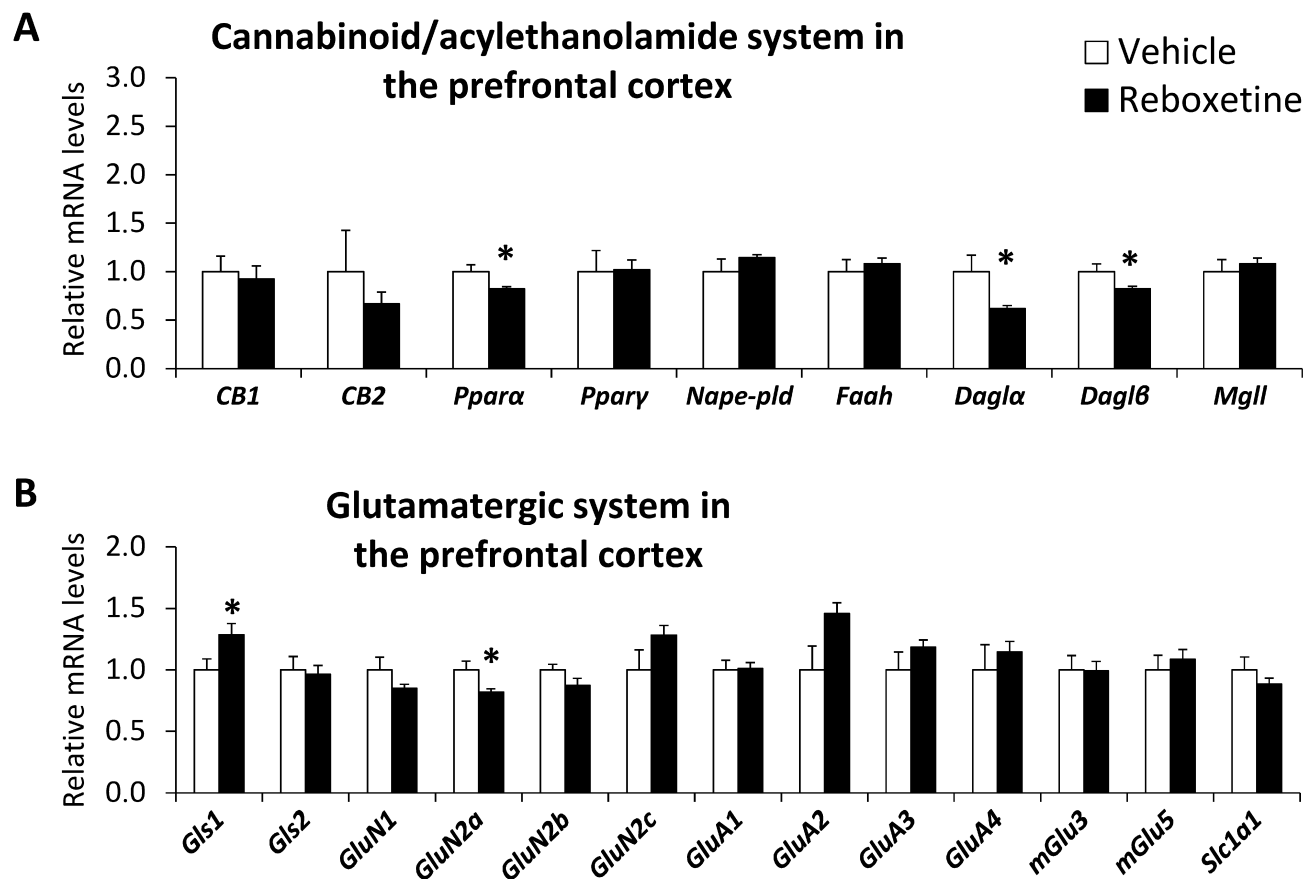


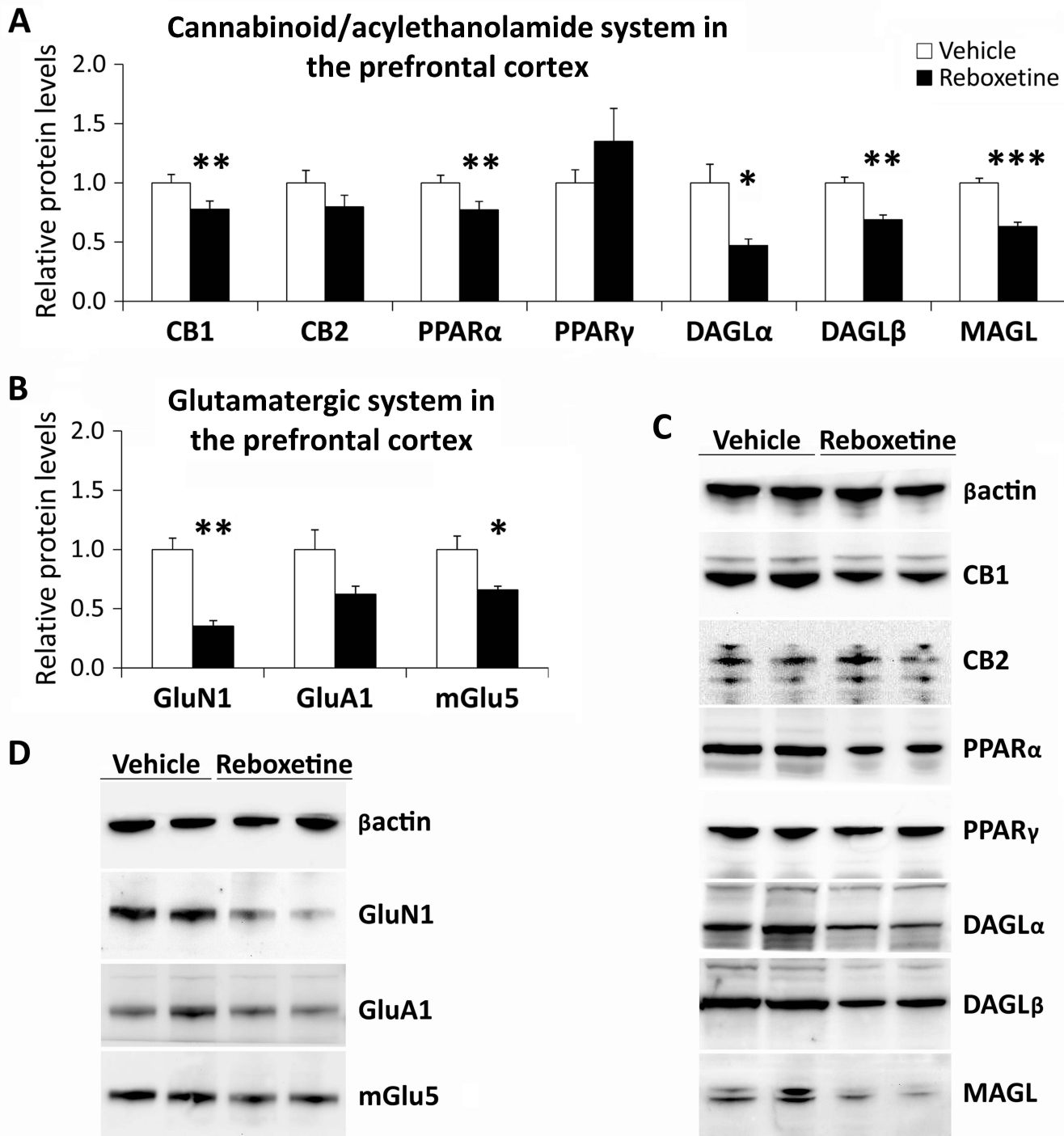
B



C

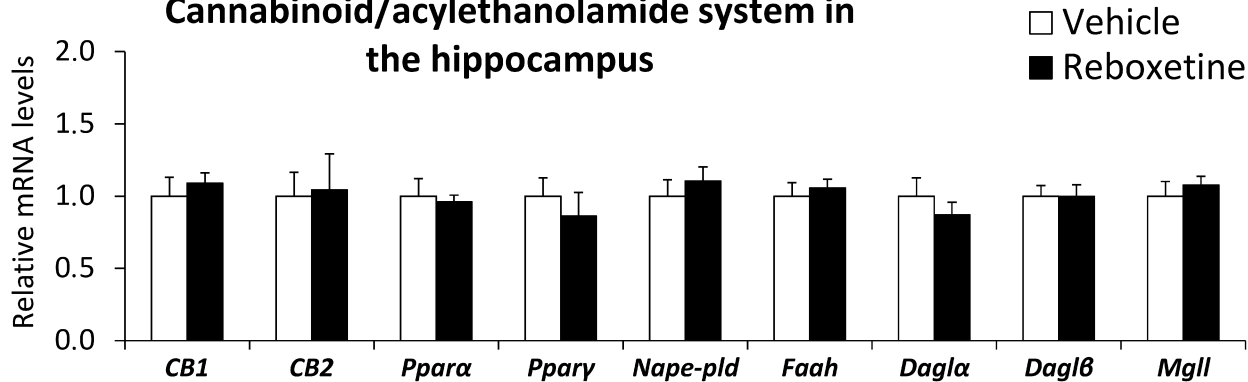






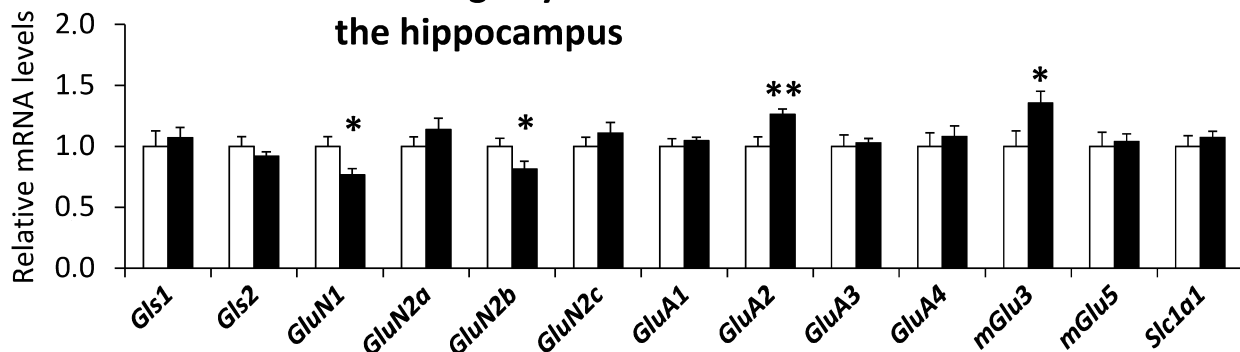
A

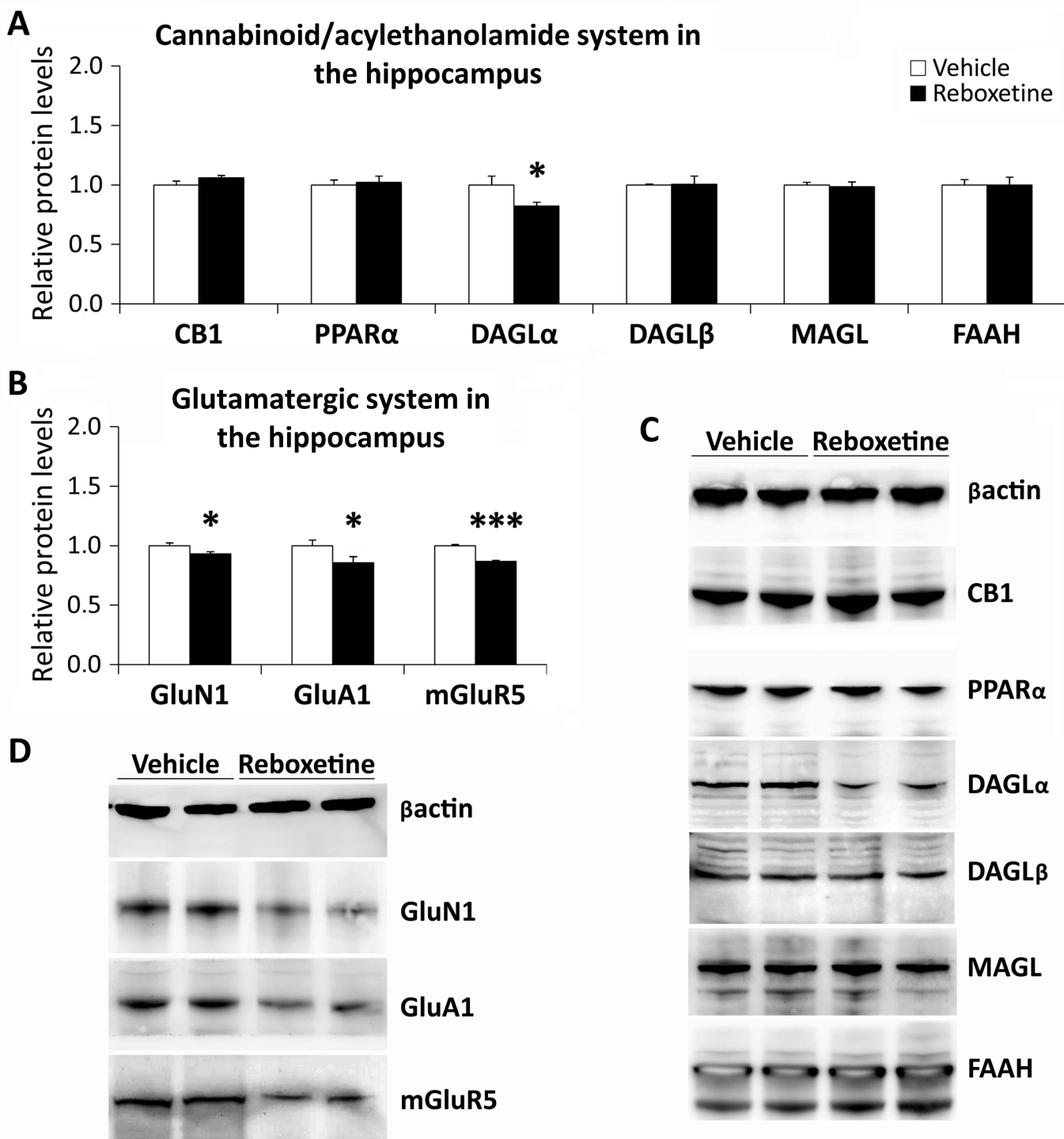
Cannabinoid/acylethanolamide system in the hippocampus



B

Glutamatergic system in the hippocampus





ANEXO 3

Ballesta A, Alén F, Rodríguez de Fonseca F, Gómez de Heras R, Orio L (2019)

Rethinking the Use of Antidepressants to Treat Alcohol Use Disorders and Depression Comorbidity: The Role of Neurogenesis. In Book: Antidepressants - Preclinical, Clinical and Translational Aspects. *IntechOpen. In press*

Rethinking the Use of Antidepressants to Treat Alcohol Use Disorders and Depression Comorbidity: The Role of Neurogenesis

Antonio Ballesta, Francisco Alén, Fernando Rodríguez de Fonseca, Raquel Gómez de Heras and Laura Orio

Abstract

Patients with alcohol use disorders (AUDs) are frequently treated with antidepressant drugs (ADs), but clinical evidence of their efficacy is contradictory. Considering that ADs are thought to produce their therapeutic effects partially by increasing hippocampal plasticity and neurogenesis (HN), and that both AUDs and depression share a potential for the disruption of these neuroplastic processes, one could reasonably wonder whether the poor efficacy of AD treatment could be explained by the inability of these drugs to exert their proper action in patients suffering from AUD or depression. In order to further clarify this question, this chapter aims to examine available data regarding the effect of ADs on behavioral and HN alterations related to alcohol abstinence, as a key period in which the treatment would be implemented and in which their potential effects on alcohol-related problems remain under controversy.

Keywords: alcohol use disorders (AUDs), antidepressants (ADs), hippocampal neurogenesis (HN), depression, comorbidity, alcohol withdrawal

1. Introduction

AUD is a chronic relapsing brain disease characterized by the presence of various symptoms, such as physically hazardous alcohol drinking, tolerance, withdrawal, or craving related to alcohol consumption, whereas MD is a psychiatric disorder characterized by low mood, anhedonia, insomnia, low motivation, apathy, and feelings of guilt, among other symptoms [1]. Epidemiological studies have shown a strong relationship between alcohol use disorders (AUDs) and depression. Indeed, the prevalence of current or lifetime alcohol problems in depression is estimated around 16% and 30%, respectively [2].

Adult hippocampal neurogenesis (HN) is a complex multistep process by which neural progenitor cells (NPCs) divide throughout life and give rise to new functional neurons in restricted regions of the adult mammalian brain (**Figure 1**, and also described in [3]). The dentate gyrus of the hippocampus is one of the brain areas that respond to stimuli through multiple mechanisms that allow the proliferation,

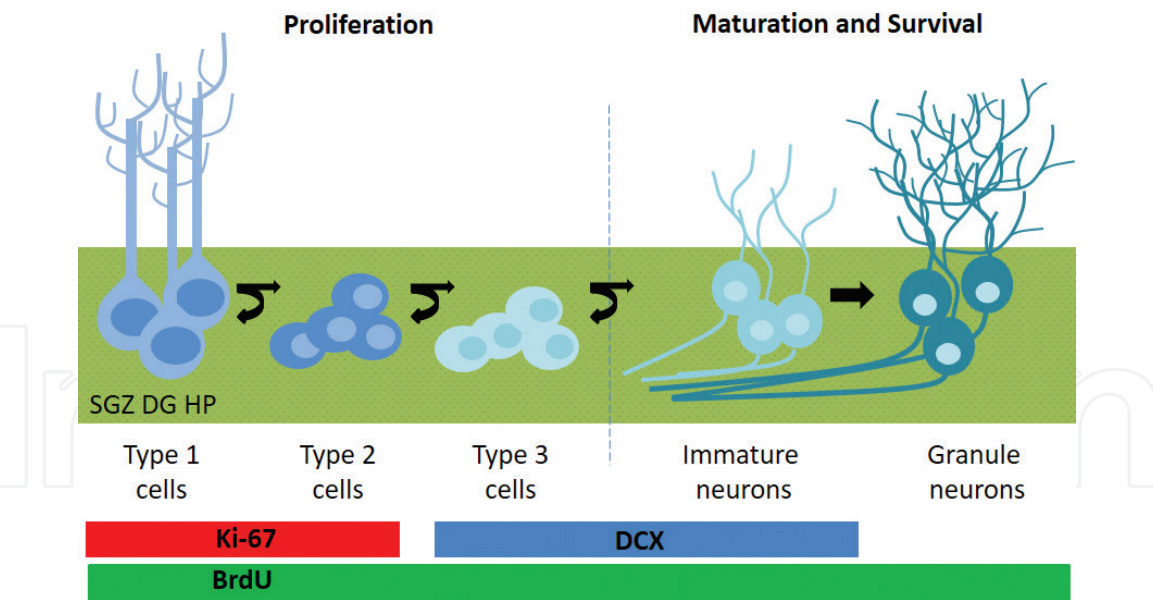


Figure 1.
Schematic representation of the stages of adult hippocampal neurogenesis in the subgranular zone of the dentate gyrus and the main immunolabeling techniques used in the cited studies.

maturation, and integration of new generated neurons in this structure, an event that appears to regulate and improve impaired cognition and mood in various disorders [4]. Both AUDs and depression have shown to compromise HN processes [5, 6]. The HN theory of depression sustains that depression results from impaired adult HN, and, therefore, its restoration leads to recovery [7]. Direct causality of HN alterations in the pathogenesis of depression seems unlikely [8], but the clinical relevance of hippocampal newly generated neurons in depression continues to be the object of study [9]. In addition, HN and plasticity processes have been proposed as a possible common neurobiological mechanism underlying alcohol withdrawal and depression [10]. In fact, HN has been proposed to significantly contribute to alcoholic pathology, although the mechanisms of alcohol-induced alterations in HN are not completely understood [6]. In this sense, there is strong evidence in animal models that alcoholic neuropathology is at least partially due to an attenuation of adult HN induced by intoxication, a state that could be reversed by spontaneous reactive HN processes during abstinence [11]. In this regard, authors have proposed that while suppression of hippocampal neurogenic proliferation appears to be a factor of comorbid vulnerability, enhancing HN into the neural circuits affected by drug may contribute to recovery [12, 13].

Antidepressants (ADs), mainly selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) and tricyclic antidepressants (TCAs), are the primary pharmacological treatment indicated for depression-diagnosed patients [14]. Concurrently, evidence of monoamine alterations in AUDs has encouraged the investigation of drugs that act on the serotonin system to treat alcohol abuse [15]. Only a few drugs with clear evidence but modest effects are approved for treatment of AUDs, as naltrexone and acamprosate, although given certain clinical circumstances, substance use disorders may require specific treatment; thus, off-label medications like ADs are also frequently prescribed, mainly in AUD depressed patients [16]. At first, the monoamine theory of depression is based on the fact that brain monoamine systems appear to regulate mood and traditional ADs, such as SSRI, and selectively increase monoamine signaling in neural pathways related to mood regulation [17]. Later, at the beginning of the century, different results supported the hypothesis that ADs might affect mood by increasing adult HN [18]. At the same time, numerous studies have led to propose that ADs can influence HN by serotonin modulation and that HN may be related to AD effects (reviewed in [19]). In agreement, postmortem studies have reported

that ADs augment NPC numbers [20, 21] and restore mature hippocampal neural population and dentate gyrus volume of depressed patients [22, 23]. These human data reflect the neurogenic potential of ADs previously reported in animals [24]. In this respect, animal studies have led to suggest that, while not causally involved in the onset of depression, HN has been related to the ability of chronic monoaminergic ADs to achieve recovery [8]. Recent studies have reopened the debate about the functional implication of adult HN in humans (see [25]), highlighting the need to further study the generation of new neurons in the adult human hippocampus. This also implies to characterize the role of HN in depression and AUDs [4, 6] and the extent to which it participates in recovery in the treatment with ADs [26].

2. Alcohol use disorders and depression

Data from AUD patients have led to the proposal that the effective components of withdrawal, such as dysphoria and depressed mood, create a motivational drive that leads to compulsive ethanol drinking behavior even after long periods of abstinence [27]. Subsequent findings promoted the hypothesis that drugs of abuse elicit pronounced euphoria followed by a negative emotional state that can disrupt homeostasis, considered key to the etiology and maintenance of the pathophysiology of addiction [28].

2.1 Clinical and preclinical evidence of AUD contribution to depressive symptomatology

Authors have considered whether there may be a causal relationship between AUDs and depression and whether one of the disorders can lead to the appearance of the other. Thus, numerous studies reveal ample evidence of the risk of depression resulting from AUDs [29]. Moreover, problematic patterns of alcohol consumption are related to depressive symptomatology, both in adult and adolescent populations [30, 31]. In an attempt to simplify the complexities of the relation between AUDs and depression, a classification of depression as primary or secondary according to whether it developed before or after the onset of the AUD was proposed. The term independent (ID) was used for a depression that began before the onset of alcohol dependence or during sustained (at least 4 weeks) abstinence, while depressive syndromes occurring only during a period of active alcohol dependence were labeled as substance-induced (SID) [32]. However, some of the depressive symptoms classified as ID could actually be substance-induced, as SID appears not to be a stable diagnosis, with about one quarter of patients initially labeled with SID meeting criteria for ID within the next 12 months [33]. Thus, SID would be considered a self-limiting condition that would tend to remit with abstinence, while ID would require specific depression treatment [32]. After receiving treatment for alcohol consumption, those with SID would show better depression outcomes and reduce their drinking more than those with ID [32]. Also, and further supporting a causal role of alcohol consumption in depression, reducing its consumption would improve the outcomes for both types of depression [34]. In the same sense, some authors have proposed that reducing hazardous drinking can improve depressive symptoms, but continued hazardous use slows recovery for psychiatric patients [35].

2.2 Preclinical evidence of the contribution of alcohol to depressive-like behavior

Animal studies might overcome the limitations of the clinical studies, allowing to obtain not only correlative information but also contributing data that would

allow a larger approach to the possible underlying causes in the relation of the AUD and depression. Several preclinical studies have assessed behavioral alterations during acute withdrawal and/or protracted abstinence in different animal models of alcohol abuse [36–47]. Studies used rodents as experimental animals, and the majority used the AUD model of chronic intermittent ethanol (CIE) vapor exposure. Behavioral analysis was carried out from a few hours (less than 24 hours) to several days or weeks after the last alcohol consumption, using the forced swimming test (FST) the most frequently used paradigm for this purpose. FST allows detecting responses toward an inescapable stress in animals based on the measurement of the time they remain immobile rather than displaying active strategies, akin to responses that would be impaired in depression. This response has been commonly described in the literature as depressive-like behavior. Affective alterations induced by alcohol were generally detected once alcohol exposure ceased, regardless of the animal model used, with few exceptions. It is interesting to note that studies evaluating both acute and chronic abstinence found occurrence of depressive-like behavior in both experimental periods although mostly after prolonged abstinence, which may indicate that the negative affective state as a consequence of abstinence, especially when maintained for prolonged periods, might be a risk factor for displaying depressive-like behavior, analogous to the way in which depression manifests itself in abstinent AUD patients.

2.3 Depression contributes to the risk of alcohol relapse

As previously mentioned, a negative affective state is not only a consequence of consumption but also could represent a maintenance factor for the addiction cycle [28]. In coherence, the “self-medication” theory postulates that the desire to avoid or alleviate preexisting or abstinence-related aversive states is a determining factor of excessive drug use and relapse [48]. Relapse is one of the most complicated components of drug addiction and involves a complex interaction of drug-associated cues that respond to multiple biological, psychiatric, psychological, and psychosocial factors which may precipitate the restoration of consumption [49, 50]. Therefore, one of the main goals in treating substance abuse is to preserve abstinence.

2.4 Clinical evidence of depressive symptomatology contributing to the risk of alcohol relapse

Clinical data strongly support the relevance of negative emotionality in protracted abstinence and relapse. Thus, for example, a higher prevalence of depressed mood has been observed in AUD patients who relapsed [51]. Depression-related low motivation has been shown to precipitate alcohol relapse, while improvements contributed to greater abstinence [52–55]. In fact, those studies have emphasized the need to treat depression to preserve abstinence and improve outcome of patients with AUD. We mentioned before that the AUD can contribute to an ID or a SID. Thus, some authors wonder whether transient symptomatology (SID) would affect consumption in the same way as the observed ID in prolonged abstinence. In this sense, it has been suggested that while affective dysregulation in protracted abstinence is likely to be of immediate relevance for relapse to excessive alcohol use, the link between the early withdrawal phenomena and subsequent affective alterations remains unclear. However, other authors have concluded that both categories should be taken into account as factors that would precipitate relapse. Specifically, SID has been associated with a shorter time for the first alcohol consumption after discharge, while ID, in addition, predicted relapse to alcohol dependence. Interestingly, ID prior to the AUD did not predict outcomes for patients [56].

2.5 Preclinical evidence of depressive-like behavior contributing to the risk of alcohol relapse

Results from clinical studies underline the need to understand possible underlying factors that contribute to the mutual negative influence of both pathologies. In this sense, animal models of AUD and depression offer the possibility of elucidating potential factors involved in the development of dual disorders [57]. Despite the prevalent comorbidity between depression and AUDs, direct evidence of causality of co-occurrence of the two pathologies is still scarce. Thus, Riga et al. [58] used a combination of models of depression and AUD through social defeat and alcohol self-administration and reported that a persistent depressive-like state led to profound alcohol reward-related changes, exaggerating the incentive salience of alcohol and facilitating cue-induced relapse to alcohol seeking. In addition, Lee et al. [47] reported higher alcohol self-administration behavior in mice which exhibited depressive-like behavior in prolonged abstinence as consequence of alcohol self-administration. It is interesting to note that this condition only occurred in animals that were exposed to alcohol during their adolescence and not in those in which the first exposure took place during adulthood, and that did not show alcohol-related affective alterations. Animal studies would show that affective alterations that persist in prolonged abstinence, regardless of whether they were related or not with alcohol exposure, would increase self-administration behavior under alcohol re-exposition.

3. Alcohol use disorders and hippocampal neurogenesis deterioration

Years ago, the proposal arose that alcohol abuse might exert its negative effect in the human brain through an induction of neuronal loss on the hippocampus. In agreement, animal models of chronic alcohol exposure have shown consistently that alcohol is toxic to hippocampal neurons, inducing cell loss. Subsequent studies have led to suggest that alcohol may result in hippocampal pathology and deterioration through effects on adult HN (see [6]).

3.1 Clinical evidence of AUDs contributing to hippocampal neurogenesis deterioration

The lack of techniques to assess adult HN in vivo in AUD patients limits the available information in this regard essentially to postmortem or neuroimaging studies. To date, we have only found one study that has shown that alcohol would have a negative effect on HN in humans [59]. Authors reported reduced numbers of three biomarkers representing different stages of the HN process: Ki67, as marker for cell proliferation, the sex determining region Y-box (Sox2) as stem/progenitor cell marker, and doublecortin (DCX) as marker of neural maturation in the dentate gyrus in subjects with ongoing alcohol abuse. These results converge with previous findings in human with a history of drug abuse [60]. Otherwise, neuroimaging studies allow the detection that alcohol abuse could also impair hippocampal volume. Indeed, some studies have revealed decreases in hippocampal volume in AUD patients, although these changes have been shown to revert with abstinence (reviewed in [61]). There is also evidence of impairment in hippocampus-related functions as consequence of problematic alcohol consumption, effects that, similarly to those found in volumetric studies, could improve with abstinence [62].

3.2 Preclinical evidence of alcohol contributing to hippocampal neurogenesis deterioration

Animal studies are useful to compensate for the limited clinical evidence in AUD patients. In fact, the most consistent evidence of alcohol-induced hippocampal impairment due to, in part, its action on HN comes from preclinical studies. In addition, the different immunolabeling techniques allow us to differentiate the stages of adult animal HN, as proliferation, maturation, migration, and survival of newly generated cells. Obtaining samples throughout different stages offers detailed information on how these processes are altered along the addictive cycle, which constitutes a great advantage over the limitations of postmortem studies in humans. The majority of *in vivo* studies have shown that alcohol intoxication leads to an overall decrease in HN through alcohol's effects on cell proliferation and survival [63], while those HN parameters show heterogeneous results when assessed throughout abstinence. Several animal studies have evaluated HN parameters along acute withdrawal and/or protracted abstinence in different AUD models. Studies mainly analyzed parameters of HN at different times throughout abstinence and reported increases, decreases, and mixed results in HN-related parameters [64–79]. Studies were mainly in rodents (except [72], done in nonhuman primates). A large part of the studies used a 4-day binge model or self-administration protocols, whereas few authors used the CIE vapor exposure model. Different immunolabeling techniques have been used to assess HN in animals, mainly the thymidine analogue bromodeoxyuridine (BrdU), which is incorporated into dividing cells and allows monitoring of newly generated neurons in the adult brain. Main relevant aspects of results from those studies are analyzed in detail in the conclusion.

3.3 Hippocampal neurogenesis deterioration contributes to the risk of alcohol relapse

Hippocampus is essential in consolidation of stimuli previously paired with drug intake, and authors have proposed that alcohol produces strong deficits in hippocampus-dependent learning and memory and attenuates hippocampal plasticity during withdrawal, which may motivate attempts to self-medicate resulting in relapse and maintenance of drug use [80]. In this sense, one way by which impaired HN could contribute to addiction would be by disrupting learning and memory and by inducing negative affective states, both factors increasing susceptibility to relapse [81]. On the other hand, research during the last decade has shown that it is possible to disrupt alcohol-induced cues and that this has a lasting impact in reducing the tendency to seek drugs and to relapse [82]. In this regard, authors have suggested that although there are a host of plastic changes that occur with abstinence, one way that the hippocampus may recover in abstinence is through the repopulation of the dentate gyrus by adult HN [6].

3.4 Clinical evidence of hippocampal neurogenesis deterioration contributes to the risk of alcohol relapse

In the same way as in the previous sections, human studies provide indirect indicators of the role of HN, such as the volume and functionality of the hippocampus. In this regard, clinical studies found that deficits in hippocampal volume in AUD patients compared with healthy controls normalize over an abstinence period of 2 weeks [83] and that hippocampal volume did not constitute a predictive factor for relapse risk in abstinent alcoholics [84]. On the other hand, it has been observed that the hippocampal-dependent functions could continue to be altered even in prolonged abstinence [62], which could be a factor that, as other authors propose,

would alter cognitive aspects linked to the risk of relapse [80]. Information from clinical studies shows that the course of the AUD would be related to the functionality of the hippocampus and not so much with alterations in its structure. Unfortunately, like the previous section, we are faced with a lack of clinical evidence in this regard, since we do not have information on the role that newly generated neurons in the hippocampus would play on the learning and memory processes involved in prevent relapse.

3.5 Preclinical evidence of hippocampal neurogenesis deterioration contributes to the risk of alcohol relapse

Numerous animal studies have led to suggest that low neurogenic states could regulate the addictive behavior, assuming a factor of addiction or comorbid vulnerability [12]. Specifically, animal models of drug addiction studies have led to propose that adult HN appears to be important for the maintenance of hippocampal neuroplasticity, such that reducing HN during abstinence may increase the vulnerability to relapse, while enhancing HN during abstinence may help reduce the risk of relapse [22]. Among the studies cited that assessed HN parameters, only one study [78] analyzed the levels of alcohol consumption after the period of abstinence. Thus, they reported augmented alcohol self-administration after 4 weeks of abstinence in animals that showed reduced HN at the end of the experiment as consequence of a combination of self-administration and vapor exposures to alcohol (dependent animals) compared to animals that showed no reductions in HN who did not receive exposure to vaporized alcohol (nondependent animals). Some results from [78] suggest that the observed reactive HN effect does not have an implication in recovery. On the contrary, animals that showed this reactive effect and lower levels of survival of newly generated neurons ended up showing higher alcohol consumption during relapse. Main implications of these findings are analyzed in the conclusion.

4. AD treatment in alcohol use disorders, depression, and hippocampal neurogenesis

Several studies have led to the suggestion that reversing depressive symptomatology [54] and HN deterioration [21] could be a therapeutical option in cases of comorbidity between AUDs and depression. Given the potential of ADs to improve affective symptoms and promote HN, it is reasonable to assume that such treatment would benefit AUD patients. The following sections attempt to clarify these aspects.

4.1 Clinical evidence of antidepressant treatment improves depressive symptomatology and hippocampal neurogenesis deterioration

Meta-analysis and reviews that integrate results of clinical studies in which patients with AUD and depression were treated with ADs show drug-dependent and inconclusive results. Some findings showed that SSRIs adequately treat depressive symptomatology in individuals with AUD and depression [85–87], while others showed that SSRIs were not more effective than placebo in treating comorbid patients [88, 89]. In relation, it has also been seen that SSRIs would not show greater effects than TCAs [90]. In fact, results from different studies using TCAs seem to converge in its effectiveness in alleviating depressive symptomatology [88, 91]. This may present differences in the response to a treatment for

depression in alcohol-dependent participants depending on the different types of depression, as a stronger effect of ADs was found in ID than in SID patients [32]. The most recent meta-analysis available concerning the efficacy of AD treatment in these patients shows a modest effect in some outcomes of depression [92]. However, most authors point out the need for more studies with similar outcome measures, well-defined sample designs, adequate doses, and duration of treatment so that the integration of studies can reach conclusions with a high quality of evidence [87, 90, 92], and some of them emphasize the need to evaluate possible alternative ADs, as, for example, nonselective or partial agonist-reuptake inhibitors [93, 94]. On the other hand, as seen in the introduction, ADs have shown to potentially increase HN in depressed patients [20, 21]. Unfortunately, no evidence of AD-related HN effect has been described in AUD patients.

4.2 Preclinical evidence of antidepressant treatment improves depressive-like behavior and hippocampal neurogenesis deterioration in alcohol exposure and abstinence

Studies in animals have suggested that the ability of AD treatment to affect HN would be linked to its behavioral therapeutic effects [8]. In fact, authors reported that increasing HN has been demonstrated to be necessary and sufficient to reduce depressive-like behavior in animals [95]. On the contrary, other authors have concluded that, although ADs promote HN, this would not be a critical event for their mood-rectifying actions [96]. In the same direction, authors have proposed that the therapeutic effect of the AD would not be determined exclusively by an increase in the number of newly generated neurons but rather in the way in which those neurons are functionally incorporated into hippocampal preexisting circuits that would be linked to recovery [97]. Few animal studies evaluated the efficacy of an AD treatment (desipramine, imipramine, and amitifadine) in a model of alcohol exposure. Studies from Getachew et al. [36, 43] found that subchronic desipramine and imipramine treatment reversed depression-like behavior and anxiety in rodents under acute withdrawal conditions. Similarly, Warnock et al. [39] reported that two different doses of acute amitifadine reversed the abstinence-induced increased immobility in the FST. Finally, Stevenson et al. [37] reported that subchronic desipramine reverted depression-like behavior and restored HN parameters, both aspects impaired under protracted abstinence conditions in mice. Similarly, other studies have tested the efficacy of AD-like drugs as 7,8-DHF, a trkB agonist [40]; trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor [76]; rolipram, a phosphodiesterase-4 inhibitor [45]; or ketamine, a N-methyl-D-aspartate receptor antagonist [42, 46], reporting that those treatments also restored the HN parameters and/or the behavioral alterations impaired by the exposure and abstinence to alcohol. In addition, non-pharmacological conditions, as wheel running or natural extracts, induced similar patterns of recovery in HN parameters [65, 77] and in depressive-like behavior [45, 50] in rodents exposed and abstinent of alcohol. This data, in conjunction with previous studies that used ADs, would suggest that if a treatment had protective effects on the HN function, it could also reflect its therapeutic effect on affective disturbances in alcohol exposed animals. Nevertheless, the causality of this relationship needs to be further elucidated. **Figure 2** illustrates the possible state and role of HN during alcohol withdrawal.

4.3 Clinical evidence of antidepressant treatment improves depressive and alcohol use disorder outcome

Although ADs are not among the first-line treatment options in AUD, they are among the additional alternative treatments available, mainly when comorbid

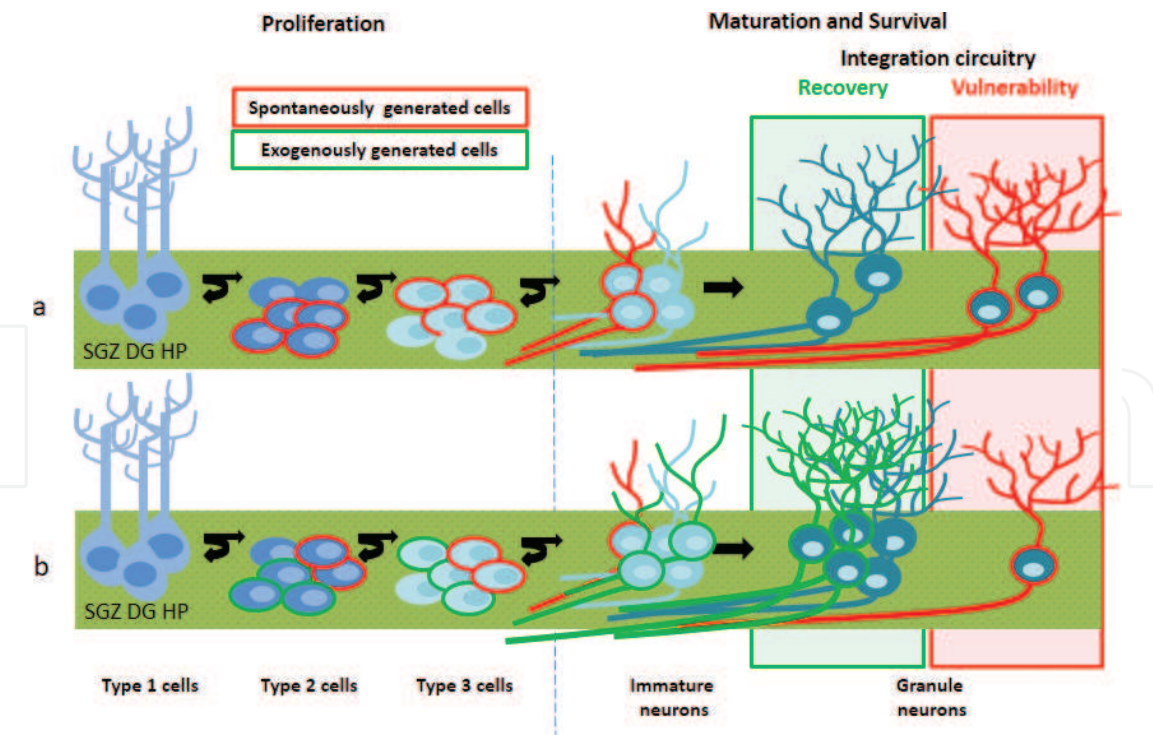


Figure 2.
(a) Schematic representation of the adult HN along alcohol withdrawal and abstinence. Spontaneous burst in cell proliferation is followed by a lower survivability and aberrant patterns of cell migration and integration of the newly generated neurons which could contribute to vulnerability related circuitry. (b) Exogenously induced cell proliferation (by physical exercise or proneurogenic treatment as ADs) could prevent the consolidation of neural circuitry involved in vulnerability, promoting survivability and integration of the newly generated neurons into neural pathways of recovery.

conditions are present [16]. In this regard, authors have proposed that AD treatment could ameliorate alcohol consumption [98], possibly by improving depressive symptoms [99]. Some of the aforementioned studies and meta-analysis evaluated alcohol-related outcomes in AUD depressed patients [87, 90, 92], showing a modest or no efficacy of AD treatment in alleviating some aspects linked to alcohol consumption. Recent conclusions show that ADs increased the number of participants abstaining during the trials and reduced the number of drinks per drinking day, while no differences were reported between ADs and placebo in other relevant outcomes of the AUD [92]. In addition to the mentioned low overall effectiveness, it is important to mention that some studies reported even poorer drinking outcomes in AUD patients treated with SSRIs compared to those treated with placebo [100–102]. In this line, studies have reported clinical cases where treatment with SSRIs appears to be the cause of increased frequency of intoxication by alcohol and new onset of alcohol-related problems [103–105]. Finally, patients who actively drink suffering of comorbid anxiety and AUD have also shown that they may increase alcohol consumption under treatment with SSRIs [106].

4.4 Preclinical evidence of antidepressant treatment improves alcohol relapse

Preclinical data concerning the effectiveness of pharmacological treatments in AUDs is still scarce [107]. Animal studies that evaluate the effect of different AD treatments on preventing alcohol consumption report reduction in alcohol intake after an acute drug dose or under short-term relapse conditions [108]. Nonetheless, taking in mind that the evaluation of the effectiveness of conventional AD treatment should be done considering the delay in its therapeutic effects, studies should go beyond short-term evaluations, assessing long-term

consequences of treatment in animal models that better mimic AUD patient conditions [109]. Thus, unlike studies using acute treatments, authors that evaluated chronic and subchronic escitalopram, sertraline, paroxetine, fluoxetine (SSRIs), and duloxetine, dual serotonin/norepinephrine reuptake inhibitor (SNRI) treatments found that, along the treatment period, animals showed lower alcohol intake levels, but cessation of treatment produced a restoration of basal alcohol consumption [110–112]. Ho et al. [110] also found an augmentation in alcohol intake in depressed animals once treatment with escitalopram ceased. Interestingly, authors also found the same effect in animals under combination of AD (escitalopram) and anti-relapse (acamprosate) treatments. Related to that, subchronic treatment with different ADs (SSRIs and SNRIs) has been demonstrated to augment alcohol consumption in animal models of alcohol deprivation, which were treated along abstinence and re-exposed to alcohol self-administration once AD treatment ended [113, 114].

5. Conclusions

Translating evidence from preclinical studies to clinical practice still creates a major challenge in development of new pharmacological treatments in AUDs. The first thing we must point out is the lack of animal studies that have evaluated the effectiveness of the AD treatment in alcohol exposure and abstinence. In this sense, it is important to highlight the numerous studies in animals that evaluate the alcohol exposure and abstinence impact on affective and HN parameters compared to the scarce studies that try to reverse such effects by testing appropriate ADs. In addition, strong criteria are needed when evaluating treatments in AUD animal models, highlighting the use of self-administration procedures and the evaluation of dependence by observing abstinence and relapse behavior. In this sense, animal studies evaluating HN alterations were mainly used as short periods (4 days) of forced alcohol exposition, while prolonged self-administration or CIE models, which better represent important aspects of alcohol consumption patterns in AUD patients, were used to a lesser extent.

One of the most direct methodological limitations when comparing clinical and preclinical studies is determined by the period in which the AD treatment begins. Preclinical studies would indicate that animals can display different affective responses to ADs according to the moment it is administered. In addition, AD cessation could have negative repercussions in alcohol consumption and relapse. While these effects should be further clarified in future studies, clinical trials should take these relevant aspects into account.

The debate about the implication of the new neurons generated in the hippocampus as a consequence of alcohol abstinence continues to be an object of interest. Despite alcohol-induced HN impairments that mainly persist along abstinence, some studies have shown increases in parameters of neural proliferation in animals mainly along early withdrawal periods. First, the possible role of this HN re-establishment effect as factor of recovery was considered, but later studies would even point to opposing hypotheses. In this regard, other findings led to the question whether neurons born during this reactive neurogenic process survive or properly integrate into the existing hippocampal circuitry to provide beneficial effects on hippocampal function and recovery. An early increase in neuronal proliferation induced by abstinence, followed by a reduction in survival in prolonged abstinence, appears to result in an increase in alcohol self-administration. Thus, this apparent AD-induced dual role of HN and the consequent changes in addictive behavior should be elucidated.

To resume, preclinical evidence strongly supports that alcohol consumption and abstinence lead to negative affective states and alterations in HN, some of which may persist in prolonged abstinence. Although affective alterations related to alcohol have been evaluated, there is limited data available concerning the alcohol-induced HN deterioration in clinical patients. Both alcohol-induced depression and changes in HN could be relevant to promote relapse, exacerbating the addictive cycle, although additional studies should clarify this complex interaction. Conventional ADs have been proposed to alleviate affective alterations possibly by promoting HN; thus AUD depressed patients could benefit from its effects. Unfortunately, clinical trials still face several limitations in order to draw reliable conclusions in this regard. Moreover, preclinical studies should bear in mind important methodological aspects onward when translating information regarding the efficacy of AD treatment into AUD patients.

Acknowledgements

The authors are grateful to funding support from Plan Nacional Sobre Drogas (PNSD), ref: 2015/005 to L.O. (Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Author details

Antonio Ballesta, Francisco Alén, Fernando Rodríguez de Fonseca,
Raquel Gómez de Heras and Laura Orio*
Department of Psychobiology and Methods in Behavioral Sciences, Faculty of
Psychology, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

*Address all correspondence to: lorio@psi.ucm.es

IntechOpen

© 2019 The Author(s). Licensee IntechOpen. This chapter is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. 

References

- [1] American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. Vol. 5. Washington, DC: American Psychiatric Association; 2013
- [2] Sullivan LE, Fiellin DA, O'Connor PG. The prevalence and impact of alcohol problems in major depression: A systematic review. *The American Journal of Medicine*. 2005;**118**(4):330-341. DOI: 10.1016/j.amjmed.2005.01.007
- [3] Balu DT, Lucki I. Adult hippocampal neurogenesis: Regulation, functional implications, and contribution to disease pathology. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2008;**33**(3):232-252. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2008.08.007
- [4] Baptista P, Andrade JP. Adult hippocampal neurogenesis: Regulation and possible functional and clinical correlates. *Frontiers in Neuroanatomy*. 2018;**12**:44. DOI: 10.3389/fnana.2018.00044
- [5] Sahay A, Hen R. Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nat Neurosci*. 2007 Sep;**10**(9):1110-1115. DOI: 10.1038/nn1969
- [6] Olsufka RA, Peng H, Newton JS, Nixon K. Alcohol effects on adult neural stem cells—A novel mechanism of neurotoxicity and recovery in alcohol use disorders. In: Rasmussen TP, editor. *Stem Cells in Birth Defects Research and Developmental Toxicology*. Hoboken, NJ: Wiley; 2018. DOI: 10.1002/9781119283249.ch8
- [7] Jacobs BL, van Praag H, Gage FH. Adult brain neurogenesis and psychiatry: A novel theory of depression. *Molecular Psychiatry*. 2000;**5**:262-269
- [8] Tanti A, Belzung C. Hippocampal neurogenesis: A biomarker for depression or antidepressant effects? Methodological considerations and perspectives for future research. *Cell and Tissue Research*. 2013;**354**(1):203-219. DOI: 10.1007/s00441-013-1612-z
- [9] Peng L, Bonaguidi MA. Function and dysfunction of adult hippocampal neurogenesis in regeneration and disease. *The American Journal of Pathology*. 2018 Jan;**188**(1):23-28. DOI: 10.1016/j.ajpath.2017.09.004
- [10] Renoir T, Pang TY, Lanfumey L. Drug withdrawal-induced depression: Serotonergic and plasticity changes in animal models. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2012;**36**(1):696-726. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2011.10.003
- [11] Crews FT, Nixon K. Mechanisms of neurodegeneration and regeneration in alcoholism. *Alcohol and Alcoholism*. 2009;**44**(2):115-127. DOI: 10.1093/alcalc/agn079
- [12] Chambers RA. Adult hippocampal neurogenesis in the pathogenesis of addiction and dual diagnosis disorders. *Drug and Alcohol Dependence*. 2013;**130**(1-3):1-12. DOI: 10.1016/j.drugalcdep.2012.12.005
- [13] Mandyam CD, Koob GF. The addicted brain craves new neurons: Putative role for adult-born progenitors in promoting recovery. *Trends in Neurosciences*. 2012;**35**(4):250-260. DOI: 10.1016/j.tins.2011.12.005
- [14] Abbing-Karahagopian V, Huerta C, Souverein PC, de Abajo F, Leufkens HGM, Slattery J, et al. Antidepressant prescribing in five European countries: Application of common definitions to assess the prevalence, clinical observations, and methodological implications. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 2014;**70**(7):849-857. DOI: 10.1007/s00228-014-1676-z

- [15] Marcinkiewicz CA, Lowery-Gionta EG, Kash TL. Serotonin's complex role in alcoholism: Implications for treatment and future research. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*. 2016 Jun;**40**(6):1192-1201. DOI: 10.1111/acer.13076
- [16] Soyka M, Müller CA. Pharmacotherapy of alcoholism—An update on approved and off-label medications. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2017;**18**(12):1187-1199. DOI: 10.1080/14656566.2017.1349098
- [17] Schildkraut JJ. The catecholamine hypothesis of affective disorders: A review of supporting evidence. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*. 1995 Fall;**7**(4):524-533; discussion 523-4
- [18] Duman RS, Nakagawa S, Malberg J. Regulation of adult neurogenesis by antidepressant treatment. *Neuropsychopharmacology*. 2001;**25**(6):836-844
- [19] Mahar I, Bambico FR, Mechawar N, Nobrega JN. Stress, serotonin, and hippocampal neurogenesis in relation to depression and antidepressant effects. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2014;**38**:173-192. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2013.11.009
- [20] Boldrini M, Underwood MD, Hen R, Rosoklija GB, Dwork AJ, Mann JJ, et al. Antidepressants increase neural progenitor cells in the human hippocampus. *Neuropsychopharmacology*. 2009;**34**(11):2376-2389. DOI: 10.1038/npp.2009.75
- [21] Boldrini M, Hen R, Underwood MD, Rosoklija GB, Dwork AJ, Mann JJ, et al. Hippocampal angiogenesis and progenitor cell proliferation are increased with antidepressant use in major depression. *Biological Psychiatry*. 2012;**72**(7):562-571. DOI: 10.1016/j.biopsych.2012.04.024
- [22] Boldrini M, Butt TH, Santiago AN, Tamir H, Dwork AJ, Rosoklija GB, et al. Benzodiazepines and the potential trophic effect of antidepressants on dentate gyrus cells in mood disorders. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2014;**17**(12):1923-1933. DOI: 10.1017/s1461145714000844
- [23] Boldrini M, Santiago AN, Hen R, Dwork AJ, Rosoklija GB, Tamir H, et al. Hippocampal granule neuron number and dentate gyrus volume in antidepressant-treated and untreated major depression. *Neuropsychopharmacology*. 2013 May;**38**(6):1068-1077. DOI: 10.1038/npp.2013.5
- [24] Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience*. 2000;**20**(24):9104-9110
- [25] Kempermann G, Gage FH, Aigner L, Song H, Curtis MA, Thuret S, et al. Human adult neurogenesis: Evidence and remaining questions. *Cell Stem Cell*. 2018;**23**(1):25-30. DOI: 10.1016/j.stem.2018.04.004
- [26] Eliwa H, Belzung C, Surget A. Adult hippocampal neurogenesis: Is it the alpha and omega of antidepressant action? *Biochemical Pharmacology*. 2017;**141**:86-99. DOI: 10.1016/j.bcp.2017.08.005
- [27] Hershenov HI. Alcohol withdrawal symptoms and drinking behavior. *Journal of Studies on Alcohol*. 1977;**38**(5):953-971
- [28] Koob GF. The dark side of emotion: The addiction perspective. *European Journal of Pharmacology*. 2015;**753**:73-87. DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.11.044

- [29] Conner KR, Pinquart M, Gamble SA. Meta-analysis of depression and substance use among individuals with alcohol use disorders. *Journal of Substance Abuse Treatment*. 2009;**37**(2):127-137. DOI: 10.1016/j.jsat.2008.11.007
- [30] Brennan PL, SooHoo S, Lemke S, Schutte KK. Alcohol use predicts 10-year depressive symptom trajectories in the health and retirement study. *Journal of Aging and Health*. 2016;**28**(5):911-932. DOI: 10.1177/0898264315615837
- [31] Skogen JC, Knudsen AK, Hysing M, Wold B, Sivertsen B. Trajectories of alcohol use and association with symptoms of depression from early to late adolescence: The Norwegian Longitudinal Health Behaviour Study. *Drug and Alcohol Review*. 2016;**35**(3):307-316. DOI: 10.1111/dar.12350
- [32] Foulds JA, Adamson SJ, Boden JM, Williman JA, Mulder RT. Depression in patients with alcohol use disorders: Systematic review and meta-analysis of outcomes for independent and substance-induced disorders. *Journal of Affective Disorders*. 2015;**185**:47-59. DOI: 10.1016/j.jad.2015.06.024
- [33] Brown RA, Ramsey SE, Kahler CW, Palm KM, Monti PM, Abrams D, et al. A randomized controlled trial of cognitive-behavioral treatment for depression versus relaxation training for alcohol-dependent individuals with elevated depressive symptoms. *Journal of Studies on Alcohol and Drugs*. 2011;**72**:286. DOI: 10.15288/jsad.2011.72.286
- [34] Foulds JA, Douglas Sellman J, Adamson SJ, Boden JM, Mulder RT, Joyce PR. Depression outcome in alcohol dependent patients: An evaluation of the role of independent and substance-induced depression and other predictors. *Journal of Affective Disorders*. 2015;**174**:503-510. DOI: 10.1016/j.jad.2014.11.052
- [35] Bahorik AL, Leibowitz A, Sterling SA, Travis A, Weisner C, Satre DD. The role of hazardous drinking reductions in predicting depression and anxiety symptom improvement among psychiatry patients: A longitudinal study. *Journal of Affective Disorders*. 2016;**206**:169-173. DOI: 10.1016/j.jad.2016.07.039
- [36] Getachew B, Hauser SR, Taylor RE, Tizabi Y. Desipramine blocks alcohol-induced anxiety- and depressive-like behaviors in two rat strains. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*. 2008;**91**:97-103. DOI: 10.1016/j.pbb.2008.06.016
- [37] Stevenson JR, Schroeder JP, Nixon K, Besheer J, Crews FT, Hodge CW. Abstinence following alcohol drinking produces depression-like behavior and reduced hippocampal neurogenesis in mice. *Neuropsychopharmacology*. 2009;**34**:1209-1222. DOI: 10.1038/npp.2008.90
- [38] Ehlers CL, Liu W, Wills DN, Crews FT. Periadolescent ethanol vapor exposure persistently reduces measures of hippocampal neurogenesis that are associated with behavioral outcomes in adulthood. *Neuroscience*. 2013;**244**:1-15. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2013.03.058
- [39] Warnock KT, Yang ARST, Yi HS, June HL, Kelly T, Basile AS, et al. Amitifadine, a triple monoamine uptake inhibitor, reduces binge drinking and negative affect in an animal model of co-occurring alcoholism and depression symptomatology. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2012;**103**(1):111-118. DOI: 10.1016/j.pbb.2012.07.014
- [40] Briones TL, Woods J. Chronic binge-like alcohol consumption in adolescence causes depression-like symptoms

possibly mediated by the effects of BDNF on neurogenesis. *Neuroscience*. 2013;**254**:324-334. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2013.09.031

[41] Pang TY, Renoir T, Du X, Lawrence AJ, Hannan AJ. Depression-related behaviours displayed by female C57BL/6J mice during abstinence from chronic ethanol consumption are rescued by wheel-running. *The European Journal of Neuroscience*. 2013;**37**(11):1803-1810. DOI: 10.1111/ejn.12195

[42] Holleran KM, Wilson HH, Fetterly TL, et al. Ketamine and MAG lipase inhibitor-dependent reversal of evolving depressive-like behavior during forced abstinence from alcohol drinking. *Neuropsychopharmacology*. 2016;**41**(8):2062-2071. DOI: 10.1038/npp.2016.3

[43] Getachew B, Hauser SR, Csoka AB11, Taylor RE, Tizabi Y. Role of cortical alpha-2 adrenoceptors in alcohol withdrawal-induced depression and tricyclic antidepressants. *Drug and Alcohol Dependence*. 2017;**175**:133-139. DOI: 10.1016/j.drugalcdep.2017.03.004

[44] Kim HJ, Park SD, Lee RM, Lee BH, Choi SH, Hwang SH, et al. Gintonin attenuates depressive-like behaviors associated with alcohol withdrawal in mice. *Journal of Affective Disorders*. 2017;**215**:23-29. DOI: 10.1016/j.jad.2017.03.026

[45] Gong MF, Wen RT, Xu Y, Pan JC, Fei N, Zhou YM, et al. Attenuation of ethanol abstinence-induced anxiety- and depressive-like behavior by the phosphodiesterase-4 inhibitor rolipram in rodents. *Psychopharmacology*. 2017;**234**(20):3143-3151. DOI: 10.1007/s00213-017-4697-3

[46] Vranjkovic O, Winkler G, Winder DG. Ketamine administration during a critical period after forced ethanol abstinence inhibits the development of

time-dependent affective disturbances. *Neuropsychopharmacology*. 2018 Aug;**43**(9):1915-1923. DOI: 10.1038/s41386-018-0102-0

[47] Lee KM, Coehlo MA, Solton NR, Szumlinski KK. Negative affect and excessive alcohol intake incubate during protracted withdrawal from binge-drinking in adolescent, but not adult mice. *Frontiers in Psychology*. 2017;**8**:1128. DOI: 10.3389/fpsyg.2017.01128

[48] Markou A, Kosten TR, Koob GF. Neurobiological similarities in depression and drug dependence: A self-medication hypothesis. *Neuropsychopharmacology*. 1998;**18**(3):135-174

[49] Durazzo TC, Meyerhoff DJ. Psychiatric, demographic, and brain morphological predictors of relapse after treatment for an alcohol use disorder. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*. 2016;**41**(1):107. DOI: 10.1111/acer.13267

[50] Milton AL, Everitt BJ. The psychological and neurochemical mechanisms of drug memory reconsolidation: Implications for the treatment of addiction. *The European Journal of Neuroscience*. 2010;**31**(12):2308-2319. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2010.07249.x

[51] Strowig AB. Relapse determinants reported by men treated for alcohol addiction: The prominence of depressed mood. *Journal of Substance Abuse Treatment*. 2000 Dec;**19**(4):469-474

[52] Cengiziz C, Deveci A, Yapici A. Effects of depression on treatment motivation in male alcohol dependence. *Noro Psikiyatri Arsivi*. 2015;**52**(4):412-416. DOI: 10.5152/npa.2015.9859

[53] Holzhauer CG, Gamble SA. Depressive symptoms mediate the relationship between changes in

emotion regulation during treatment and abstinence among women with alcohol use disorders. *Psychology of Addictive Behaviors*. 2017;**31**(3): 284-294. DOI: 10.1037/adb0000274

[54] Suter M, Strik W, Moggi F. Depressive symptoms as a predictor of alcohol relapse after residential treatment programs for alcohol use disorder. *Journal of Substance Abuse Treatment*. 2011;**41**(3):225-232. DOI: 10.1016/j.jsat.2011.03.005

[55] Heilig M, Egli M, Crabbe JC, Becker HC. Acute withdrawal, protracted abstinence and negative affect in alcoholism: Are they linked? *Addiction Biology*. 2010;**15**(2):169-184. DOI: 10.1111/j.1369-1600.2009.00194.x

[56] Samet S, Fenton MC, Nunes E, Greenstein E, Aharonovich E, Hasin D. Effects of independent and substance-induced major depressive disorder on remission and relapse of alcohol, cocaine and heroin dependence. *Addiction*. 2012;**108**(1):115-123. DOI: 10.1111/j.1360-0443.2012.04010.x

[57] Ng E, Browne CJ, Samsom JN, AHC W. Depression and substance use comorbidity: What we have learned from animal studies. *The American Journal of Drug and Alcohol Abuse*. 2017;**43**(4):456-474. DOI: 10.1080/00952990.2016.1183020

[58] Riga D, Schmitz LJ, van der Harst JE, van Mourik Y, Hoogendijk WJ, Smit AB, et al. A sustained depressive state promotes a guanfacine reversible susceptibility to alcohol seeking in rats. *Neuropsychopharmacology*. 2014;**39**(5):1115-1124. DOI: 10.1038/npp.2013.311

[59] Le Maître TW, Dhanabalan G, Bogdanovic N, Alkass K, Druid H. Effects of alcohol abuse on proliferating cells, stem/progenitor cells, and immature neurons in

the adult human hippocampus. *Neuropsychopharmacology*. 2018;**43**(4):690-699. DOI: 10.1038/npp.2017.251

[60] Bayer R, Franke H, Ficker C, Richter M, Lessig R, Büttner A, et al. Alterations of neuronal precursor cells in stages of human adult neurogenesis in heroin addicts. *Drug and Alcohol Dependence*. 2015;**156**:139-149. DOI: 10.1016/j.drugalcdep.2015.09.005

[61] Wilson S, Bair JL, Thomas KM, Iacono WG. Problematic alcohol use and reduced hippocampal volume: A meta-analytic review. *Psychological Medicine*. 2017;**47**(13):2288-2301. DOI: 10.1017/S0033291717000721

[62] Staples MC, Mandyam CD. Thinking after drinking: Impaired hippocampal-dependent cognition in human alcoholics and animal models of alcohol dependence. *Frontiers in Psychiatry*. 2016;**7**:162. DOI: 10.3389/fpsy.2016.00162

[63] Xu C, Loh HH, Law PY. Effects of addictive drugs on adult neural stem/progenitor cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2015;**73**(2):327-348. DOI: 10.1007/s00018-015-2067-z

[64] Nixon K, Kim DH, Potts EN, He J, Crews FT. Distinct cell proliferation events during abstinence after alcohol dependence: Microglia proliferation precedes neurogenesis. *Neurobiology of Disease*. 2008;**31**(2):218-229. DOI: 10.1016/j.nbd.2008.04.009

[65] Maynard ME, Leasure JL. Exercise enhances hippocampal recovery following binge ethanol exposure. *PLoS ONE*. 2013;**8**(9):e76644. DOI: 10.1371/journal.pone.0076644

[66] McClain JA, Morris SA, Marshall SA, Nixon K. Ectopic hippocampal neurogenesis in adolescent male rats following alcohol dependence.

Addiction Biology. 2013;**19**(4):687-699.
 DOI: 10.1111/adb.12075

2010;**107**(24):11104-11109. DOI:
 10.1073/pnas.0912810107

[67] Nickell CRG, Peng H, Hayes DM, Chen KY, McClain JA, Nixon K. Type 2 neural progenitor cell activation drives reactive neurogenesis after binge-like alcohol exposure in adolescent male rats. *Frontiers in Psychiatry*. 2017;**8**:283. DOI: 10.3389/fpsyt.2017.00283

[73] Broadwater MA, Liu W, Crews FT, Spear LP. Persistent loss of hippocampal neurogenesis and increased cell death following adolescent, but not adult chronic ethanol exposure. *Developmental Neuroscience*. 2014;**36**(3-4):297-305. DOI: 10.1159/000362874

[68] Hayes DM, Nickell CG, Chen KY, McClain JA, Heath MM, Deeny MA, et al. Activation of neural stem cells from quiescence drives reactive hippocampal neurogenesis after alcohol dependence. *Neuropharmacology*. 2018;**133**:276-288. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2018.01.032

[74] Vetreno RP, Crews FT. Binge ethanol exposure during adolescence leads to a persistent loss of neurogenesis in the dorsal and ventral hippocampus that is associated with impaired adult cognitive functioning. *Frontiers in Neuroscience*. 2015;**9**:35. DOI: 10.3389/fnins.2015.00035

[69] Hansson AC, Nixon K, Rimondini R, et al. Long-term suppression of forebrain neurogenesis and loss of neuronal progenitor cells following prolonged alcohol dependence in rats. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2010;**13**(5):583-593. DOI: 10.1017/S1461145710000246

[75] Morris SA, Eaves DW, Smith AR, Nixon K. Alcohol inhibition of neurogenesis: A mechanism of hippocampal neurodegeneration in an adolescent alcohol abuse model. *Hippocampus*. 2010;**20**(5):596-607. DOI: 10.1002/hipo.20665

[70] Crews FT, Mdzinarishvili A, Kim D, He J, Nixon K. Neurogenesis in adolescent brain is potently inhibited by ethanol. *Neuroscience*. 2006;**137**(2):437-445. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2005.08.090

[76] Sakharkar AJ, Vetreno RP, Zhang H, Kokare DM, Crews FT, Pandey SC. A role for histone acetylation mechanisms in adolescent alcohol exposure-induced deficits in hippocampal brain-derived neurotrophic factor expression and neurogenesis markers in adulthood. *Brain Structure and Function*. 2016;**221**(9):4691-4703. DOI: 10.1007/s00429-016-1196-y

[71] Richardson HN, Chan SH, Crawford EF, Lee YK, Funk CK, Koob GF, et al. Permanent impairment of birth and survival of cortical and hippocampal proliferating cells following excessive drinking during alcohol dependence. *Neurobiology of Disease*. 2009;**36**(1):1-10. DOI: 10.1016/j.nbd.2009.05.021

[77] Vetreno RP, Lawrimore CJ, Rowsey PJ, Crews FT. Persistent adult neuroimmune activation and loss of hippocampal neurogenesis following adolescent ethanol exposure: Blockade by exercise and the anti-inflammatory drug indomethacin. *Frontiers in Neuroscience*. 2018;**12**. DOI: 10.3389/fnins.2018.00200

[72] Taffe MA, Kotzebue RW, Crean RD, Crawford EF, Edwards S, Mandyam CD. Long-lasting reduction in hippocampal neurogenesis by alcohol consumption in adolescent nonhuman primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.

[78] Somkuwar SS, Fannon MJ, Staples MC, Zamora-Martinez ER, Navarro AI, Kim A, et al. Alcohol

dependence-induced regulation of the proliferation and survival of adult brain progenitors is associated with altered BDNF-TrkB signaling. *Brain Structure & Function*. 2016;**221**(9):4319-4335. DOI: 10.1007/s00429-015-1163-z

[79] Liu W, Crews FT. Persistent decreases in adult subventricular and hippocampal neurogenesis following adolescent intermittent ethanol exposure. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2017;**11**:151. DOI: 10.3389/fnbeh.2017.00151

[80] Kutlu MG, Gould TJ. Effects of drugs of abuse on hippocampal plasticity and hippocampus-dependent learning and memory: Contributions to development and maintenance of addiction. *Learning & Memory*. 2016;**23**(10):515-533. DOI: 10.1101/lm.042192.116

[81] Canales JJ. Deficient plasticity in the hippocampus and the spiral of addiction: Focus on adult neurogenesis. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*. 2013;**15**:293-312. DOI: 10.1007/7854_2012_230

[82] Cui C, Noronha A, Warren K, Koob GF, Sinha R, Thakkar M, et al. Brain pathways to recovery from alcohol dependence. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*. 2015;**49**(5):435-452. DOI: 10.1016/j.alcohol.2015.04.006

[83] Kühn S, Charlet K, Schubert F, Kiefer F, Zimmermann P, Heinz A, et al. Plasticity of hippocampal subfield volume cornu ammonis 2+3 over the course of withdrawal in patients with alcohol dependence. *JAMA Psychiatry*. 2014;**71**(7):806-811. DOI: 10.1001/jamapsychiatry.2014.352

[84] Gross CM, Spiegelhalder K, Mercak J, Feige B, Langosch JM. Predictability of alcohol relapse by hippocampal volumetry and psychometric variables. *Psychiatry Research*. 2013;**212**(1):14-18. DOI: 10.1016/j.psychres.2012.09.011

[85] Danovitch I, Steiner AJ, Kazdan A, Goldenberg M, Haglund M, Mirocha J, et al. Analysis of patient-reported outcomes of quality of life and functioning before and after treatment of major depressive disorder comorbid with alcohol use disorders. *Journal of Addiction Medicine*. 2017;**11**(1):47-54. DOI: 10.1097/adm.0000000000000268

[86] Davis LL, Wisniewski SR, Howland RH, Trivedi MH, Husain MM, Fava M, et al. Does comorbid substance use disorder impair recovery from major depression with SSRI treatment? An analysis of the STAR*D level one treatment outcomes. *Drug and Alcohol Dependence*. 2010;**107**(2-3):161-170. DOI: 10.1016/j.drugalcdep.2009.10.003

[87] Nunes EV, Levin FR. Treatment of depression in patients with alcohol or other drug dependence: A meta-analysis. *JAMA*. 2004;**291**(15):1887-1896. DOI: 10.1001/jama.291.15.1887

[88] Iovieno N, Tedeschini E, Bentley KH, Evins AE, Papakostas GI. Antidepressants for major depressive disorder and dysthymic disorder in patients with comorbid alcohol use disorders: A meta-analysis of placebo-controlled randomized trials. *The Journal of Clinical Psychiatry*. 2011;**72**(8):1144-1151. DOI: 10.4088/JCP.10m06217

[89] Zhou X, Qin B, Del Giovane C, Pan J, Gentile S, Liu Y, et al. Efficacy and tolerability of antidepressants in the treatment of adolescents and young adults with depression and substance use disorders: A systematic review and meta-analysis. *Addiction*. 2015;**110**(1):38-48. DOI: 10.1111/add.12698.10

[90] Torrens M, Fonseca F, Mateu G, Farré M. Efficacy of antidepressants in substance use disorders with and without comorbid depression. A systematic review and meta-analysis. *Drug and Alcohol Dependence*.

2005;**78**(1):1-22. DOI: 10.1016/j.drugalcdep.2004.09.004

[91] Cornelius J, Chung T, Douaihy A, Kirisci L, Glance J, Kmiec J, et al. A review of the literature of mirtazapine in co-occurring depression and an alcohol use disorder. *Journal of Addictive Behaviors, Therapy & Rehabilitation*. 2016;**5**(4):159. DOI: 10.4172/2324-9005.1000159

[92] Agabio R, Trogu E, Pani PP. Antidepressants for the treatment of people with co-occurring depression and alcohol dependence. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2018;**4**. Art. No.: CD008581. DOI: 10.1002/14651858.CD008581.pub2

[93] Nunes EV, Levin FR. Treatment of co-occurring depression and substance dependence: Using meta-analysis to guide clinical recommendations. *Psychiatric Annals*. 2008;**38**(11)

[94] Belmer A, Patkar OL, Pitman KM, Bartlett SE. Serotonergic neuroplasticity in alcohol addiction. *Brain Plasticity*. 2016;**1**(2):177-206. DOI: 10.3233/BPL-150022

[95] Hill AS, Sahay A, Hen R. Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to reduce anxiety and depression-like behaviors. *Neuropsychopharmacology*. 2015;**40**(10):2368-2378. DOI: 10.1038/npp.2015.85

[96] Bessa JM, Ferreira D, Melo I, Marques F, Cerqueira JJ, Palha JA, et al. The mood-improving actions of antidepressants do not depend on neurogenesis but are associated with neuronal remodeling. *Molecular Psychiatry*. 2009;**14**(8):764-773. DOI: 10.1038/mp.2008.119

[97] Mateus-Pinho A, Pinto L, Bessa JM, Morais M, Alves ND, Monteiro S, et al. Sustained remission from depressive-like

behavior depends on hippocampal neurogenesis. *Translational Psychiatry*. 2013;**3**(1):e210. DOI: 10.1038/tp.2012.141

[98] Graham K, Massak A. Alcohol consumption and the use of antidepressants. *CMAJ*. 2007;**176**(5):633-637. DOI: 10.1503/cmaj.060446

[99] Mann K. Pharmacotherapy of alcohol dependence: A review of the clinical data. *CNS Drugs*. 2004;**18**(8):485-504. DOI: 10.2165/00023210-200418080-00002

[100] Charney DA, Heath LM, Zikos E, Palacios-Boix J, Gill KJ. Poorer drinking outcomes with citalopram treatment for alcohol dependence: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*. 2015;**39**(9):1756-1765. DOI: 10.1111/acer.12802

[101] Chick J, Aschauer H, Hornik K. Efficacy of fluvoxamine in preventing relapse in alcohol dependence: A one-year, double-blind, placebo-controlled multicentre study with analysis by typology. *Drug and Alcohol Dependence*. 2004;**74**(1):61-70. DOI: 10.1016/j.drugalcdep.2003.11.012

[102] Dundon W, Lynch KG, Pettinati HM, Lipkin C. Treatment outcomes in type A and B alcohol dependence 6 months after serotonergic pharmacotherapy. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 2004;**28**:1065-1073. DOI: 10.1097/01.alc.0000130974.50563.04

[103] Atigari OV, Kelly AM, Jabeen Q, Healy D. New onset alcohol dependence linked to treatment with selective serotonin reuptake inhibitors. *The International Journal of Risk & Safety in Medicine*. 2013;**25**(105-109). DOI: 10.3233/JRS-130586

- [104] Brookwell L, Hogana C, Healya D, Manginb D. Ninety-three cases of alcohol dependence following SSRI treatment. *The International Journal of Risk & Safety in Medicine*. 2014;**26**: 99-107. DOI: 10.3233/JRS-140616
- [105] Menkes DB, Herxheimer A. Interaction between antidepressants and alcohol: Signal amplification by multiple case reports. *The International Journal of Risk & Safety in Medicine*. 2014;**26**(3):163-170. DOI: 10.3233/JRS-140632
- [106] Gimeno C, Dorado ML, Roncero C, Szerman N, Vega P, Balanzá-Martínez V, et al. Treatment of comorbid alcohol dependence and anxiety disorder: Review of the scientific evidence and recommendations for treatment. *Frontiers in Psychiatry*. 2017;**8**:173. DOI: 10.3389/fpsy.2017.00173
- [107] Barajaz AM, Kliethermes CL. An assessment of the utilization of the preclinical rodent model literature in clinical trials of putative therapeutics for the treatment of alcohol use disorders. *Drug and Alcohol Dependence*. 2017;**181**:77-84. DOI: 10.1016/j.drugalcdep.2017.09.022
- [108] Simon O'Brien E, Legastelois R, Houchi H, Vilpoux C, Alaux-Cantin S, Pierrefiche O, et al. Fluoxetine, desipramine, and the dual antidepressant milnacipran reduce alcohol self-administration and/or relapse in dependent rats. *Neuropsychopharmacology*. 2011;**36**: 1518-1530. DOI: 10.1038/npp.2011.37
- [109] Bell RL, Hauser SR, Liang T, Sari Y, Maldonado-Devincci A, Rodd ZA. Rat animal models for screening medications to treat alcohol use disorders. *Neuropharmacology*. 2017;**122**:201-243. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2017.02.004
- [110] Ho AMC, Qiu Y, Jia YF, Aguiar FS, Hinton DJ, Karpyak VM, et al. Combined effects of acamprosate and escitalopram on ethanol consumption in mice. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*. 2016;**40**(7):1531-1539. DOI: 10.1111/acer.13099
- [111] Gulley JM, McNamara C, Barbera TJ, Ritz MC, George FR. Selective serotonin reuptake inhibitors: Effects of chronic treatment on ethanol-reinforced behavior in mice. *Alcohol*. 1995;**12**(3):177-181. DOI: 10.1016/0741-8329(94)00079-s
- [112] Skelly MJ, Weiner JL. Chronic treatment with prazosin or duloxetine lessens concurrent anxiety-like behavior and alcohol intake: Evidence of disrupted noradrenergic signaling in anxiety-related alcohol use. *Brain and Behavior*. 2014;**4**(4):468-483. DOI: 10.1002/brb3.230
- [113] Alén F, Orio L, Gorriti MA, de Heras RG, Ramírez-López MT, Pozo MA, et al. Increased alcohol consumption in rats after subchronic antidepressant treatment. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2013;**16**:1809-1818. DOI: 10.1017/s1461145713000217
- [114] Alén F, Serrano A, Gorriti MÁ, Pavón FJ, Orio L, de Heras RG, et al. The administration of atomoxetine during alcohol deprivation induces a time-limited increase in alcohol consumption after relapse. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2014;**17**(11):1905-1910. DOI: 10.1017/s146114571400087x